



Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2017

Hjulsager, Charlotte Kristiane; Krog, Jesper Schak; Kvisgaard, Lise Kirstine; Madsen, Jesper J.; Thorup, Kasper; Larsen, Lars Erik

Publication date:
2018

Document Version
Også kaldet Forlagets PDF

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Hjulsager, C. K., Krog, J. S., Kvisgaard, L. K., Madsen, J. J., Thorup, K., & Larsen, L. E. (2018). Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2017. Kgs. Lyngby: Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet.

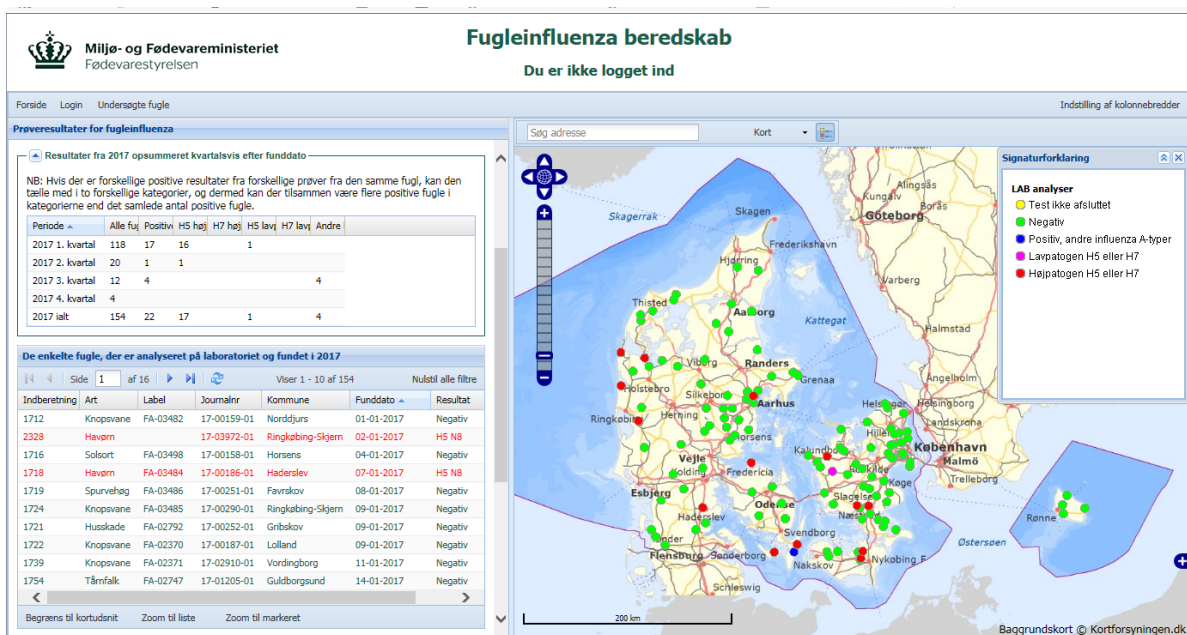
General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2017



Maj 2018

Charlotte K. Hjulsgaard

DTU Veterinærinstituttet

Denne rapport beskriver resultaterne der er opnået i henhold til "Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2017". Overvågningen er udført af DTU Veterinærinstituttet (DTU-VET) i samarbejde med Fødevarestyrelsen (FVST) og Statens Naturhistoriske Museum (SNM).

2017 har igen været et specielt år, idet der har været udbrud af højpatogen fugleinfluenza i vilde fugle i Europa inkl., Danmark. Udbruddet startede i november 2016 og fortsatte ind i 2017. Nærværende rapport indeholder ikke en uddybende karakterisering af udbruddet, men data fra 2017 er beskrevet. Uddybende analyser er endnu ikke afsluttede og afventer flere data som tilvejebringes i 2018.

En stor tak rettes til indsamlerne af prøver fra vilde fugle i naturen, herunder de frivillige ringmærkere. Vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food, Klosterheden Vildt og Alpevej Vildtbehandling takkes for nedlagt fjervildtprøver. Private borgere takkes for så vidt angår døde fugle til den passive overvågning for fugleinfluenza.

Endvidere takkes laboranter og dyrlæger i PCR-diagnostik, virologi, serologi og patologi, Afdeling for Diagnostik og Beredskab, DTU-VET, for omhyggelig udførelse af laboratorieundersøgelserne.

Vibeke Frøkjær Jensen, Afdeling for Diagnostik og Beredskab, DTU-VET takkes for at tegne kortene over prøveindsamling og resultater, figur 2 og 3.

Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2017

Rapport, final version, 20. juli 2018.

Af

Charlotte K Hjulsgaard, DTU Veterinærinstituttet

Jesper S Krog, DTU Veterinærinstituttet

Lise K Kvisgaard, DTU Veterinærinstituttet

Jesper J Madsen, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet

Kasper Thorup, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet

Lars E Larsen, DTU Veterinærinstituttet

Copyright: Hel eller delvis gengivelse af denne publikation er tilladt med kildeangivelse.

Forsidefotos: Oversigt over resultater fra den passive overvågning 2017, <http://fvst.gis34.dk/>.

Gråænder, Nana Hjulsgaard Mathiesen. Undersøgelse af død vild fugl, DTU-VET.

Udgivet af: Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet, Kemitorvet B202, 2800 Kgs. Lyngby, Danmark.

Sammenfatning og konklusion

Overvågning af fugleinfluenza, aviær influenza (AI), på EU niveau går tilbage til 2002, og Danmark følger EU kommissionens bestemmelser for udformning af overvågningen, der har skiftet gennem årene i takt med indhøstede erfaringer.

I 2017 blev der udført EU lovomfattet passiv overvågning af døde vilde fugle, der blev fundet i naturen. Der blev testet 154 fugle. Udbrud af højpatogen aviær influenza (HPAI) virus subtype H5N8, der startede i 2016 ved fund af HPAI H5N8 virus i en død troldand fundet den 7. november i Stadsgraven ved Christiania, København, fortsatte i 2017. HPAI H5N8 blev i alt påvist i 17 døde vilde fugle i 2017 (1 ederfugl, 3 havørne, 7 musvåger, 1 pibeand, 3 svartbager, 1 sølvmåge, 1 vandrefalk) fordelt over det meste af landet. HPAI H5N8 er dermed i alt påvist i 82 vilde fugle, der blev fundet døde i naturen i perioden fra 7. november 2016 til 4. april 2017.

HPAI H5N8 blev også påvist i en hobby besætning beliggende ved Helsingør i november 2016, og i gæs fra et museum ved Maribo i februar 2017.

Molekylærphylogenetisk analyse af HA genet i HPAI H5N8 virus fundet i Danmark i 2016 og 2017 viste, at disse virus er nært beslægtede med hinanden og med samtidige HPAI H5 clade 2.3.4.4b virus fra andre europæiske lande. Virus adskiller sig imidlertid genetisk fra HPAI H5N8 clade 2.3.4.4a virus fra vinteren 2014/2015, hvor der var enkelte fund af HPAI i fjerkræ og/eller døde vilde fugle i England, Tyskland, Holland, Italien, Ungarn og Sverige.

Der blev også udført en aktiv overvågning af AI virus i vilde fugle i Danmark i 2016. Denne blev udført i samarbejde mellem Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet (DTU-VET), Fødevarestyrelsen (FVST) og Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet (SNM) i henhold til "Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2017" (bilag 5). Omfanget af overvågningen var som i 2016, dvs. reduceret til 900 fugle i forhold til de foregående år og kun med fokus på H5/H7 virus.

Der blev i alt testet 896 fugle som 248 pools af kloaksvabere fra op til 5 fugle af samme art, fundet på samme sted og på samme tid. I lighed med proceduren i 2013-2016, blev prøverne udtaget fra enkeltdyr og sendt til laboratoriet (DTU-VET), hvor de blev poollet inden test. Prøverne blev indsamlet i Jylland, på Fyn, Lolland, Sjælland og i Hovedstadsregionen. FVST varetog udtagelse af prøver fra 445 fugle fra nedlagte ænder og gæs, der var indleveret på vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food, Alpevej Vildtbehandling og Klosterheden Vildt. Statens Naturhistoriske Museum (SNM) koordinerede indsamling af prøver fra 451 vildtlevende fugle. I alt 73 pools (29 %) blev fundet positive for AI virus ved PCR. Af disse var 15 (21 %) lavpatogen AI (LPAI) H5, der blev ikke påvist LPAI H7 i prøverne. Andelen og antallet af positive pools i 2017 var på niveau med tidligere år. Materiale fra positive pools blev podet i æg med henblik på at isolere AI virus, succesraten var 19 %, hvilket er på niveau med tidligere år.

I lighed med 2014-2016, var overvågningen i 2017 udvidet med molekylær karakterisering af de virus, der blev påvist både i vilde fugle og i fjerkræ, og dette bidrog til en dybere og mere præcis karakterisering af virus, så vi ret præcist ved hvilke virus varianter, vi har påvist. Dermed er opnået en god indikation af hvilke AI virus, der cirkulerer i Danmark, og en viden om at disse virus pt. ikke udgør en øget trussel mod den humane sundhed. Overvågningen viser dog, at der til stadighed cirkulerer LPAI H5 og H7 virus i den vilde fauna, som potentielt kan true dyresundheden, så der er fortsat et behov for at overvåge forekomsten af AI virus i fjerkræflokke.

Fylogenetisk analyse af LPAI H5 gener fra virus påvist i 2017 viste, at disse var nært beslægtede med H5 gener fra virus i prøver fra vilde fugle, der blev indsamlet i Danmark de foregående år, samt med virus fra vilde fugle

og fjerkræ i Europa. Analysen afslørede som forventet også en betydelig genetisk drift i forhold til de tidligere år.

Sekventering af LPAI H5 generne gav også mulighed for at undersøge, hvor godt de anvendte RT-PCR assays, som er de samme der anvendes til diagnostisk undersøgelse af AI mistanker, matcher nutidige AI virus. Resultatet af analysen af de tre H5 specifikke RT-PCR assays viste, at de overordnet set er anvendelige overfor de virus, der cirkulerer i Danmark i dag, på trods af den drift i sekvenserne, som afsløres af fuldlængde HA sekventeringen. Men analysen viste også, at det er nødvendigt med en strategi, der involverer samtidig anvendelse af flere af disse subtypningsassays for en sensitiv påvisning af LPAI H5 virus.

Fitness-analysen understregede vigtigheden af, at der foretages en løbende monitorering af drift i sekvenserne, så de anvendte assays kan opdateres ved behov. Da EU referencelaboratoriet sjældent har adgang til LPAI sekvenser fra vilde fugle i real-time, og da der endvidere kun sker et meget begrænset fund/offentliggørelse af fund af LPAI H5/H7 virus i vilde fugle, kan EU referencelaboratoriet ikke udføre en fyldestgørende analyse af driften i H5/H7 virus. Det er derfor nødvendigt, at vi selv holder øje med situationen under danske forhold, via en fortsat overvågning af driften i H5/H7 virus. På den måde kan vi bedst sikre, at vi har det rette værktøj til at påvise H5/H7 virus med høj sensitivitet, når der opstår mistanke om AI virus i danske fjerkræbesætninger, og således hurtigt få kontrol over de anmeldeligt AI virus til gavn for både dyresundheden og samfundsøkonomien.

2016-2017 har på europæisk plan især været præget af udbrud med HPAI H5N8 i vilde fugle og fjerkræ i en lang række lande, og udveksling af virus mellem disse segmenter. Dette gælder også i Danmark. Der var ikke udbrud af LPAI virus i fjerkræ i Danmark i 2017. I 2016 var der udbrud af LPAI virus i to gråandeflokke på hhv. Fyn (juli 2016) og i Nordjylland (august 2016), hvor der blev påvist hhv. H7N7 og H5N2 i forbindelse med virologisk screening af rutine overvågningsprøver i fjervildtopdræt.

Indholdsfortegnelse

Sammenfatning og konklusion	3
Indholdsfortegnelse.....	5
Introduktion.....	6
Baggrund	6
Formål.....	9
Materialer og metoder	10
Prøveindsamling, passiv overvågning - døde vilde fugle.....	10
Prøveindsamling, aktiv overvågning - raske vilde fugle	10
PCR-screening, -subtypning og patogenicitetsbestemmelse	10
Dyrkning og subtypning af isolater samt patogenicitetsbestemmelse	10
Resultater og diskussion.....	11
Passiv overvågning - døde vilde fugle.....	11
Aktiv overvågning – levende vilde fugle	13
Prøver	13
PCR resultater	15
Virusisolater.....	16
Prøver indeholdende flere virus	17
Sammenligning med resultater fra tidligere år	17
Molekylær karakterisering af AI virus.....	18
H5 evaluering af diagnostiske assays	18
H5 LPAI diversitet	19
H5 HPAI diversitet.....	21
H7 diversitet	22
H9 virus.....	22
AI virus i fjerkræ	23
Referencer	25
Bilag 1. Oversigt over den passive overvågning	27
Bilag 2. Oversigt over den aktive overvågning	30
Bilag 3. Virusisolatoversigter	31
Bilag 4. Match mellem virus sekvenser og primere og prober i diagnostiske H5 RT-PCR assays.....	32
Bilag 5. Projektplan for overvågningen af AI i vilde fugle i Danmark 2017.	35

Introduktion

Baggrund

Aviær influenza (AI) er en smitsom virusinfektion, som kan angribe alle fuglearter, og som er forårsaget af influenza A virus. Influenza A virus tilhører *Orthomyxoviridae* virusfamilien og har et negativ-sense, enkeltstrenget, segmenteret RNA genom. Influenza A virus kan inficere mange dyrearter inkl. mennesker, grise, heste og fugle. Vilde fugle af ordenerne *Anseriformes* (ænder, gæs og svaner) og *Charadriiformes* (måger, terner og vadefugle) menes at udgøre det naturlige reservoir for influenza A virus (Verhagen et al. 2011).

Influenza A virus udviser en stor diversitet. Mest udtalt er den genetiske og antigene variation af overfladeproteinerne hæmagglutinin (HA) og neuraminidase (NA). Virus klassificeres ud fra den antigene variation af disse HA og NA proteiner. I fugle kendes 16 hovedvarianter af HA og 9 varianter af NA. De findes i mange kombinationer, og disse såkaldte virussubtyper (f.eks. H1N1, H5N1 og H7N3) anvendes i influenza A virus klassifikation og nomenklaturen. AI virus kan yderligere klassificeres på baggrund af deres patogene fænotype i kyllinger. Højpatogen aviær influenza (HPAI) er en akut systemisk sygdomstilstand i fjerkræ, hvor mortaliteten kan være op til 100 %. HPAI er med meget få undtagelser begrænset til virus af subtyperne H5 og H7, men det er ikke alle H5 og H7 virus, der er højpatogene. Alle andre aviære influenzavirus er lavpatogene (LPAI), og forvolder mildere eller ingen sygdom (Verhagen et al. 2011). Udvikling af sygdom efter infektion med AI virus er værtsafhængig, således at et givent virus i nogle arter giver kliniske symptomer, mens det i andre arter giver mildere symptomer eller slet ingen. LPAI virus forekommer enzootisk hos vilde fugle, mens kun få HPAI virus er enzootisk forekommende og kun udenfor Europa (f.eks. H5N1) (Alexander, 2000a).

Udbrud af HPAI i fjerkræ kendes tilbage til 1959, hvor det første udbrud med HPAI H5N1 blev påvist i høns i Skotland. Frem til omkring 2003 var der ca. 20 udbrud i tamfjerkræ med HPAI H5 eller H7 virus på verdensplan. Frekvensen af udbrud har siden været stigende. De fleste udbrud har været i høns og har typisk involveret fra tusindvis til millioner af dyr (Alexander, 2007). I 2003 ændrede situationen sig imidlertid dramatisk, idet HPAI H5N1 af asiatisk oprindelse blev enzootisk forekommende i dele af Asien og bredte sig til Europa og Afrika, hvor virus har været årsag til udbrud i vilde fugle og/eller fjerkræ i over 60 lande, heraf 24 europæiske (Cattoli et al. 2009). Udover at være et problem i fjerkræproduktionen, anses HPAI H5N1 virus for at være en betydelig human trussel med mere end 400 fatale tilfælde og en frygt for, at dette virus vil kunne udvikle sig til et virus med pandemisk potentiale (Capua og Alexander, 2007).

Ved udbrud af HPAI i fjerkræ, især i tamænder der opdrættes på friland, vil der være risiko for overførsel til vildfugle populationen (Alexander 2007) og virus kan potentielt spredes over store afstande af vilde fugle, især hvis de ikke eller kun i ringe grad er klinisk syge (Keawcharoen et al. 2008).

LPAI virus kan mutere til HPAI virus. Aminosyre sekvensen omkring HA kløvningsstedet er afgørende for patogeniteten, men konstellationen af de øvrige gener og individuelle genmutationer spiller ligeledes en rolle (Hatta et al. 2001; Stech et al. 2009). De faktorer der medfører transition fra LPAI til HPAI kendes ikke. I nogle tilfælde ser det ud til at virus har muteret fra LPAI til HPAI umiddelbart efter introduktion af LPAI til fjerkræ, mens LPAI virus i andre tilfælde har cirkuleret i månedsvis før den/de nødvendige mutationer er sket (Banks et al. 2001). Det er således rimeligt at antage, at risikoen for, at ændringen fra LPAI til HPAI vil ske, afhænger af hvor længe og hvor mange LPAI virus der cirkulerer i en flok (Alexander, 2007). Dermed er det en uønsket situation at have LPAI H5/H7 virus cirkulerende i fjerkræflokke, og således er det vigtigt at undgå introduktion af LPAI H5/H7 virus. Hvis introduktion sker, er en hurtig diagnose og effektiv bekæmpelse, f.eks. ved

de-population (aflivning), af yderste vigtighed. Vilde fugle er i nogle tilfælde identificeret som en mulig kilde til introduktion af virus til fjerkræflokke (Alexander, 2007). Dette kan ske enten ved direkte kontakt eller indirekte kontakt, hvor andre dyrearter, mennesker eller utensilier mekanisk har båret virus ind i flokken. Denne sekundære transmission af virus er i nogle større udbrud af AI, kædet sammen med bevægelse af personale og materiel mellem besætninger. Virus er stabilt i miljøet og kan overleve i længere tid i f.eks. overfladevand, som dermed udgør en kilde til virus og bidrager til cirkulation af virus i bestanden af vilde fugle, især svømmefugle (Alexander, 2007).

LPAI virus kan inddeles i to fylogenetiske hovedlinjer: den eurasiske og den amerikanske linje. Denne opdeling af influenzavirus kan forklares ud fra den geografiske og økologiske adskillelse af fugle der benytter trækruter enten over Europa/Asien/Afrika/Australien eller Amerika (Munster and Fouchier, 2009; Verhagen et al. 2011). Ud over den geografiske opdeling af AI virus ses også en opdeling baseret på værtspopulationer. Et eksempel herpå er H13 og H16 subtyper der primært isoleres fra måger og terner (*Charadriiformes*) (Fouchier et al. 2005). Disse AI virus har udviklet sig til separate genetiske linjer, der er forskellige fra AI virus af subtyperne H1 – H12 der primært findes i ænder (*Anseriformes*) (Munster et al. 2007).

I starten af 2014 blev der rapporteret udbrud af et nyt euroasiatisk H5N8 virus i trækfugle og fjerkræ i Kina, Japan og Korea. Dette virus var højpatogent i fjerkræ og er et reassortment med H5 fra clade 2.3.4.4 HPAI. Der har ikke været rapporter om at dette virus har forårsaget sygdom i mennesker eller andre pattedyr. I vinteren 2014/2015 blev dette virus rapporteret fra både vilde fugle og fjerkræ i EU (Tyskland, Holland, UK, Sverige, Italien, Ungarn). Genetiske undersøgelser af virus fra både vilde fugle og fjerkræ peger på en rolle for vilde fugle i spredningen af virus. H5N8 viruset blev også fundet i USA, og reassorterede efterfølgende med amerikansk linje NA gener. Reassorterede HPAI H5 clade 2.3.4.4 virus med andre N typer end N8 (H5N5, H5N6) er ligeledes fundet i Asien.

I 2016 blev der igen rapporteret om HPAI H5N8 virus i Europa. Det første fund var 27. oktober 2016 i en vild fugl i Ungarn. En uge senere blev der rapporteret om det første udbrud i fjerkræ i Ungarn. Virusset spredte sig herefter hurtigt til de fleste europæiske lande, herunder Danmark 7. november 2016. I første omgang blev udbrud især set i forbindelse med massedødsfald blandt troldænder. Senere var der også mange fund i måger og rovfugle. Udbruddet fortsatte ind i 2017, og omfattede pr. 3. maj 2018 tusindevis af udbrud i fjerkræ, vilde fugle og fugle i fangenskab i 59 lande, men ingen humane cases (http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/H5N8/situation_update.html).

Genetiske analyser af HA genet indikerer at udbruddene er forårsaget af nært beslægtede virus, som danner et distinkt fylogenetisk cluster, og at de er forskellige fra H5N8 virus fra 2014/2015-udbruddene i EU. De europæiske HPAI H5N8 virus fra 2014/2015 kaldes nu for H5 clade 2.3.4.4a virus, mens europæiske HPAI H5N8 virus fra 2016/2017 kaldes for H5 clade 2.3.4.4.b. Det er sandsynligt, at virus er introduceret med vilde fugle fra Rusland via hhv. en nord- og en centraleuropæisk rute. Virus er tæt beslægtet med virus, der blev påvist tidligere på året i Tyva, Rusland. FAO (The Food and Agriculture Organization) advarede i september 2016 om, at der var stor risiko for spredning af HPAI H5N8 vest og syd for Tyva med trækfugle, på baggrund af dette fund og ved sammenligning med dynamikken af tidligere introduktioner af HPAI virus til Europa (Sims et al. 2016).

Udover H5N8, er der i mindre omfang påvist HPAI reassortments H5N5 og H5N6 i Europa. Disse virus er sandsynligvis opstået ved reassortment mellem H5N8 HPAI og lokale lavpatogene virus. De er således ikke nært beslægtede med humanpatogene H5N6 virus fra Sydøstasien, der siden 2014 har krævet 6 dødsfald i Kina, blandt 19 laboratoriebekræftede tilfælde (WHO).

H9N2 virus er enzootisk forekommende i forskellige typer af terrestrisk fjerkræ flere steder på det euroasiatiske kontinent, nogle gange med øget sygelighed. Dette virus blev første gang påvist i Guangdong provinsen i Kina i 1994. Smitte til mennesker med dødelig udgang er forekommet og virus har doneret interne gener til zoonotiske influenzavirus Asian H7N9 og H10N8.

Virus med subtypen H7N9 kendes fra tidligere, men i marts 2013 blev en særlig H7N9 variant, i det efterfølgende benævnt "Asian H7N9", fundet i Kina. Dette specifikke virus menes at være opstået ved multiple reassortment events af virus fra asiatiske fugle; H7N9 viruset har formodentlig fået sit HA gen fra domesticerede ænder, NA genet fra vilde fugle og de resterende gener fra H9N2 virus fra domesticeret fjerkræ. Viruset er udbredt i fjerkræ i Kina. Viruset kendtes i begyndelsen kun i en lavpatogen form (LPAI) i fjerkræ, som dog kunne forårsage alvorlig sygdom i mennesker. Der har været 1624 laboratoriediagnosticerede humane tilfælde af infektion, primært i Kina, heraf mindst 621 med dødelig udgang (pr. 24. januar 2018). Siden februar 2017 er der også påvist HPAI H7N9 virus i fjerkræ. Dette virus kan også smitte mennesker og forårsagede en stigning i antallet af humane tilfælde under den 5. bølge af H7N9 epidemien (oktober 2016 - september 2017) og en geografisk spredning af tilfældene. Sideløbende med de humane cases er nye tilfælde i fjerkræ og omgivelserne (http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/H7N9/situation_update.html).

I perioden 2003 – 2017 (inkl.) har der været 860 laboratoriediagnosticerede humane tilfælde af smitte med asian lineage HPAI H5N1 virus fra 16 lande indrapporteret til WHO, heraf 454 med dødelig udgang (http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2018_03_02_tableH5N1.pdf?ua=1&ua=1).

De fleste tilfælde er fra Asien, især Indonesien og Vietnam, og Egypten. I 2017 er kun indrapporteret 4 tilfælde, heraf 2 med dødelig udgang. De humane cases relateres til kontakt med smittede levende eller døde fugle eller inficeret miljø.

2016 og 2017 har på europæisk plan især været præget af udbrud med HPAI H5N8 i vilde fugle og fjerkræ i en lang række lande, og udveksling af virus mellem disse segmenter. Dette gælder også Danmark.

Formål

Formålet med AI overvågningen i vilde fugle i Danmark er at sikre en tidlig påvisning af HPAI (passiv overvågning) og at belyse vilde fugles rolle i spredningen af AI virus (aktiv overvågning). Overvågningen udføres som en virologisk screening, der primært er rettet mod AI virus med subtyperne H5 og H7. Fund af andre AI virus i vilde fugle subtypes så vidt muligt. Via den molekylære karakterisering af de virus, der påvises i vilde fugle i den danske fauna, og fjerkræ der opdrættes på dansk grund, opnås en mere præcis karakterisering af virus end blot på subtype niveau, fx til hurtig karakterisering af H7 virus med henblik på identifikation af Asian H7N9 like virus og andre varianter af AI virus med zoonotisk potentiale. De molekylære analyser frembringer ligeledes værdifulde data til en løbende evaluering af egnetheden af de molekylærdiagnostiske assays, der anvendes til at undersøge mistanker om AI i fjerkræ. Dette er en stadig nødvendighed, da AI virus konstant muterer.

AI overvågningen i vilde fugle i Danmark i 2017 bestod af:

1) Passiv overvågning.

Overvågning for HPAI i døde og syge vilde fugle i medfør af Kommissionens afgørelse af 25. juni 2010 (2010/367/EU), bilag II. Målgruppen af fugle er angivet i artslisten (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:32010D0367>).

FVST indberettede laboratorieresultaterne fra den passive overvågning til EU kommissionen.

2) Aktiv overvågning.

En national aktiv overvågning for LPAI virus i levende vilde fugle, herunder nedlagte fugle.

3) Molekylær karakterisering.

Udvalgte virus og gener fra 1) + 2), samt virus i fjerkræbesætninger påvist i forbindelse med AI mistanker og virologisk overvågning af opdrættet fjervildt, blev karakteriseret molekylært med fokus på karakterisering af H5 og H7 virus.

Materialer og metoder

Prøveindsamling, passiv overvågning - døde vilde fugle

Kadavere af fugle fundet døde i naturen blev indsendt til DTU-VET, hvor der blev udtaget kloaksvabere og/eller trachealsvabere i AI kloak(flerstyrke)medie hhv. enkeltstyrkemedie til analyse for AI virus. Svaberne blev testet enkeltvist eller som pools af kloak- og svælgsvaber fra den samme fugl udtaget i kloakmedie. Laboratoriesvar blev sendt til indsender med kopi til FVST, Dyresundhed. Fuglene og de tilhørende laboratorieresultater blev ligeledes løbende registreret i FVST's offentligt tilgængelige fugleinfluenza database (<http://fvst.gis34.dk/>).

Prøveindsamling, aktiv overvågning - raske vilde fugle

Til den aktive overvågning af raske vilde fugle blev der indsamlet kloaksvaberprøver fra vilde fugle, som i det efterfølgende er opdelt i to kategorier baseret på indsamlingsmetoden:

1) Nedlagt fjervildt. FVST varetog udtagelse af prøver fra nedlagte ænder og gæs, der var indleveret på vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food, Alpevej Vildtbehandling og Klosterheden Vildt, i alt 445 fugle. Prøverne blev udtaget i perioden 11. september - 20. november 2017, og indsendt på køl til DTU-VET med FVST's kurerservice.

2) Levende fugle. SNM koordinerede udtagelse af prøver fra vildtlevende fugle, der enten blev fanget og frigivet i forbindelse med ringmærkning eller nedlagt ved jagt samme dag, som prøverne blev taget. Prøverne blev udtaget som kloaksvabere i kloak(flerstyrke)medie og indleveret eller indsendt med PostNord til DTU-VET på køl. Der blev indsendt prøver fra 451 fugle, indsamlet 7. februar og i perioden 1. september - 14. december 2017.

Prøver fra op til 5 fugle af samme art og udtaget på samme tid og sted, blev poolet på laboratoriet før test. Alle pools blev undersøgt på DTU-VET med laboratoriemetoder udført i henhold til den diagnostiske manual for aviær influenza, EU direktiv 2005/94/EF, med mindre andet er angivet.

PCR-screening, -subtypning og patogenicitetsbestemmelse

Alle pools blev indledningsvist screenet for tilstedeværelsen af Influenza A virus med real-time RT-PCR målrettet matrix-genet. Influenza A virus positive pools blev subtypet med specifik RT-PCR (real-time og/eller konventionel RT-PCR) mod H5 og H7 subtyperne. H5 og H7 positive pools blev ligeledes konfirmeret ved sekventering henover HA-kløvningsstedet, og sekvensen blev anvendt til bestemmelse af patogeniciteten som hhv. lavpatogen AI virus (LPAI) og højpatogen AI virus (HPAI)

Dyrkning og subtypning af isolater samt patogenicitetsbestemmelse

Alle pools, der var PCR positive for AI virus, blev podet i embryonerede hønseæg med det formål at isolere virus. AI virusisolater blev påvist med pan-AI RT-PCR, og H og N subtypet ved anvendelse af hæmagglutinations inhibitionstest (HI-test) og neuraminidase inhibitionstest (N-test), og/eller ved sekventering af HA og NA generne med in-house protokoller med primere modificeret fra Hofmann et al. (2001). I de fleste tilfælde hvor virusisolaterne ikke var AI virus, blev isolaterne testet med RT-PCR for PMV1 og evt. ved HI-test overfor aviær paramyxovirustype PMV1-9 antisera.

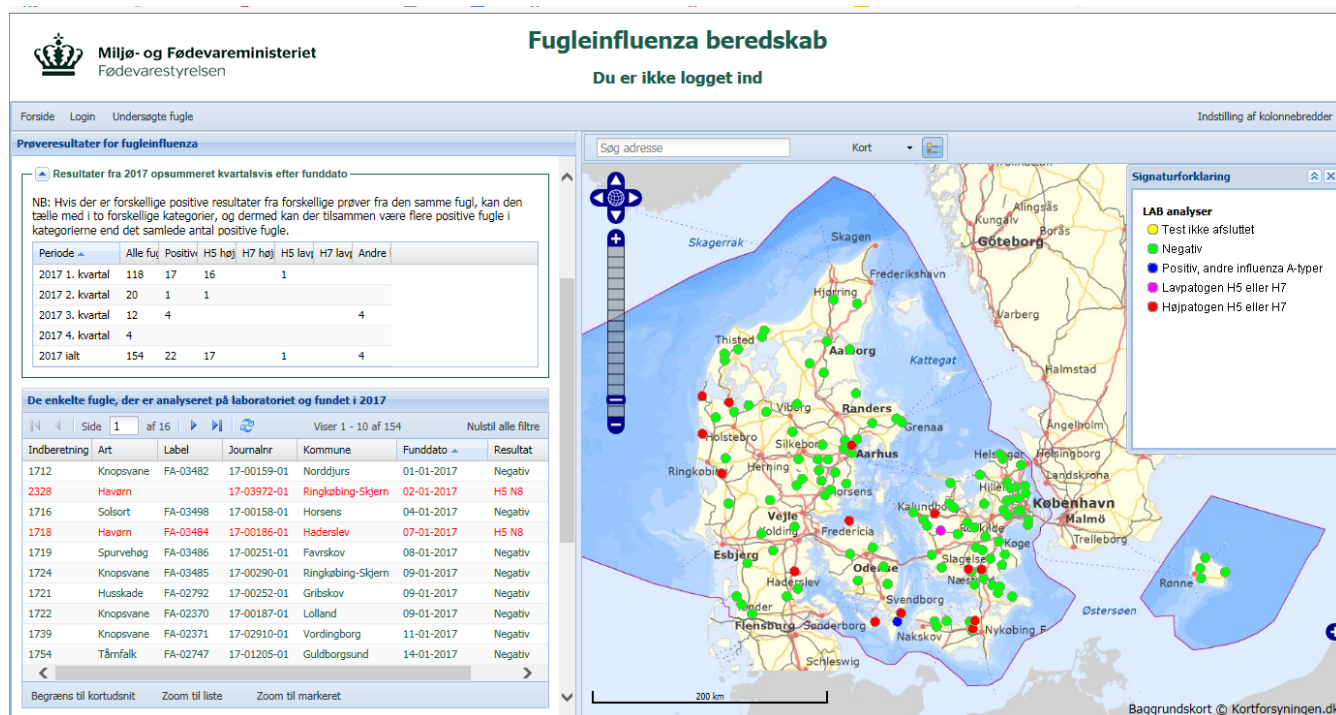
Resultater og diskussion

Passiv overvågning - døde vilde fugle

Som led i den passive overvågning for AI virus i 2017, blev der testet 154 fugle, som var fundet døde i naturen (figur 1, bilag 1). Elleve af disse var indsendt til faldvildtundersøgelser under Center for Vildtsundhed, mens de øvrige var rekvireret undersøgt af FVST pga mistanke om HPAI.

I 2016, med start den 7. november, blev der påvist H5N8 HPAI virus i 65 døde vilde fugle i Danmark (1 duehøg, 1 ederfugl, 3 havørne, 1 hættemåge, 8 knopsvaner, 5 musvåger, 1 ravn, 1 sangsvane, 3 stormmåger, 9 svartbager, 4 sølvmåger, 28 troldænder). Dette udbrud i vilde fugle fortsatte i 2017, hvor H5N8 HPAI virus blev påvist i 17 vilde fugle (1 ederfugl, 3 havørne, 7 musvåger, 1 pibeand, 3 svartbager, 1 sølvmåge, 1 vandrefalk). Seneste fund af H5N8 HPAI virus var i en havørn fundet på Æbelø ved Nordfyn den 4. april 2017. Desuden blev H5 LPAI virus påvist i en knopsvane og influenza A virus, som ikke var H5 eller H7, blev påvist i 4 gråænder fundet sammen. I 2017 var der en overvægt af fund af HPAI virus i rovfugle og måger, hvilket er i modsætning til 2016, hvor der især tidligt i udbruddet var en overvægt af positive fund i svømmeænder og svaner.

Den geografiske fordeling af fugle indsendt til undersøgelse i 2017 fremgår af figur 1. De testede fugle er fundet fordelt over hele landet. De positive fund er koncentreret i den sydlige og vestlige del af Danmark. Dette er i modsætning til 2016, hvor de positive fugle blev fundet udbredt øst for en akse fra Frederikshavn i nord til Sønderborg i syd.



Figur 1. Passiv overvågning af AI, Danmark 2017. Detaljerede oplysninger fremgår af <http://fvst.gis34.dk/> og bilag 1.

Tendensen fra 2016 med at de positive fund af H5N8 HPAI virus bevægede sig over tid fra øst mod vest og dernæst op langs den jyske østkyst er dermed fortsat i 2017. Ligeledes er tendensen til artssammensætningen af positive fugle fortsat, så det primært er rovfugle og måger der er fundet positive hen mod slutningen af perioden. Forklaringen herpå er uafklaret, men kunne måske være at rovfugle og

måger smittes ved sekundær smitte via indtagelse af inficerede fødeemner, og dermed indikere at nye introduktioner af HPAI virus ind i Danmark ikke er forekommet i 2017.

I den periode hvor der er påvist HPAI H5N8 i vilde fugle i Danmark, er der også påvist HPAI H5N8 i en lang række europæiske lande og flere steder i Asien, Afrika og Mellemøsten. Baseret på sekvensanalyse af HA og NA generne er H5N8 virus påvist i Danmark nært beslægtet med virus fra det øvrige Europa (afsnit om H5 HPAI diversitet).

Tabel 1. Oversigt over den passive overvågning af AI i Danmark 2009-2017.

Døde vilde fugle	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Antal fugle testet	83	56	33	18	10	10	37	204	154
AI virus PCR positive	1	3	1	2	0	0	1	66	22
H5/H7 LPAI positive	1	0	0	0	0	0	0	0	1
H5/H7 HPAI positive*	0	0	0	0	0	0	0	65	17

*alle HPAI virus var H5N8 HPAI.

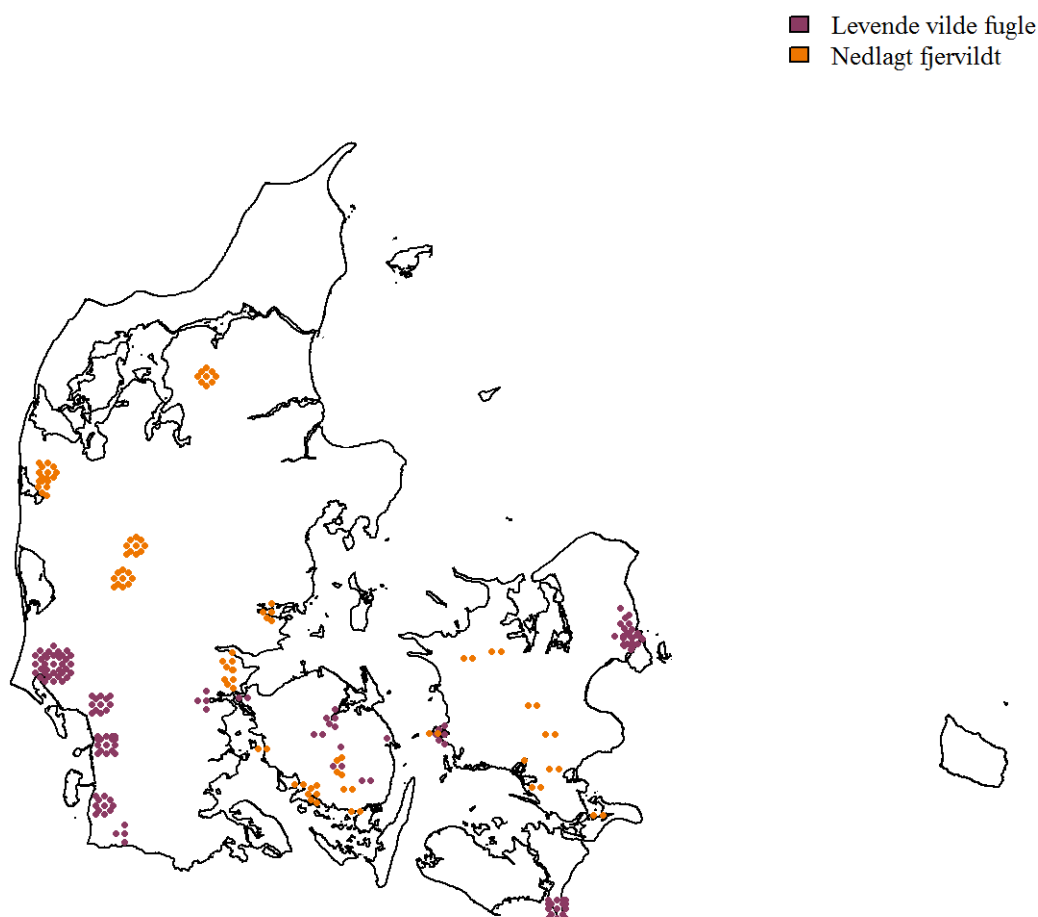
Aktiv overvågning – levende vilde fugle

Prøver

Indsamlingen var målrettet de arter, som bedst muligt tilgodeser ønsket om at indsamle prøver fra fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til fugleinfluenza (jf. EU kommissionsafgørelsen nr. 367 af 25. juni 2010), hvilket primært er vandfuglearter. Der blev indsamlet prøver fra vilde fugle indleveret på vildthåndteringsvirksomheder ("Nedlagt fjervildt") og fra raske vilde fugle i naturen ("Levende fugle").

I kategorien "nedlagt fjervildt" blev der indsamlet kloaksvaberprøver fra 445 fugle med nedskudssteder geografisk fordelt som vist i figur 2. Fuglene var skudt ved jagt og indleveret på vildthåndteringsvirksomheder, hvor prøverne blev udtaget.

I kategorien "levende fugle" indgik kloaksvaberprøver fra 451 fugle. Ringmærkere fra Ringmærkningscentralen, Statens Naturhistoriske Museum, indsamlede kloaksvabere fra vildtlevende fugle på flere lokaliteter (figur 2). De "levende fugle" blev enten fanget og frigivet i forbindelse med ringmærkning, eller nedlagt ved jagt samme dag som prøverne blev taget.



Figur 2. Indsamlingssteder på postnr.-niveau for fugle i den aktive overvågning for aviær influenza 2017. Både nedskudssteder for fugle i kategorien "nedlagt fjervildt", hvorfra der blev udtaget prøver på vildthåndteringsvirksomheder, og indsamlingslokaliteter for kategorien "levende fugle", der dækker over prøver indsamlet af Statens Naturhistoriske Museum (SNM), er vist på kortet. Hvert punkt repræsenterer én pool, punkterne er distribueret i koncentriske cirkler med oprindelse i centrum af disse cirkler.

Der blev i alt undersøgt 248 pools af kloaksvabere fra 896 fugle fordelt på 20 arter og de fleste landsdele (tabel 2). Geografisk fordelte fuglene sig med 64 % fra Jylland og 8 % fra Hovedstadsområdet. Dermed blev målet om at få inddraget en stor andel af vilde fugle fra Jylland, og kun en mindre del fra Hovedstadsområdet, nået.

Tabel 2. Antal fugle fordelt på arter og landsdele, 2017.

Art	Jylland	Fyn	Sjælland	Hovedstadsområdet	Sum (antal fugle)
Alm. ryle			2		2
Blishøne		4		1	5
Bramgås	49		15		64
Dobbeltbekkasin	1				1
Grønbenet rørhøne		1			1
Gråand, levende fugle	45	18		24	87
Gråand, nedlagt fjervildt	262	83	67		412
Grågås, levende fugle	12		15	1	28
Grågås, nedlagt fjervildt	27				27
Hættemåge	9	2		23	34
Knopsvane		3		4	7
Krikand, levende fugle	52	1			53
Krikand, nedlagt	6				6
Måge				2	2
Pibeand	83				83
Skovsneppe	8				8
Spidsand	21				21
Spurvehøg			30		30
Stor præstekrave			6		6
Stormmåge				3	3
Strandhjejle			1		1
Sølvmåge				5	5
Troldand				10	10
Sum (antal fugle)	575	112	136	73	896

Lokalitet: KBH, Hovedstadsområdet postnr. 1xxx, 2xxx; Sjælland, postnr. 3xxx, 4xxx; Fyn, postnr. 5xxx; Jylland, postnr. 6xxx, 7xxx, 8xxx, 9xxx. Fangstmetode: Nedlagt, nedlagt fjervildt fra vildthåndteringsvirksomheder; Levende, levende ved prøveudtagelse eller skudt ved jagt umiddelbart forinden.

Indsamlingen af prøver var koncentreret i efterårshalvåret, ud fra den erfaring at chancen for at finde fugleinfluenzavirus er størst i denne periode. I 2017 blev der indsamlet prøver fra 31 fugle i 1. kvartal. De var alle fra Hovedstadsområdet og negative for influenzavirus. Prøver fra de resterende fugle blev indsamlet i perioden 1. september – 14. december og fordelte sig med 238 fugle i 3. kvartal og 627 i 4. kvartal. Der blev testet i alt 896 fugle fordelt i 248 prøver, heraf var 201 pools af mere end én prøve og 47 var enkeltprøve-pools (tabel 3).

Tabel 3. Oversigt over antal fugle i de testede prøver, 2017.

Antal fugle pr. pool	Antal pools testet		Antal fugle
	Levende fugle	Nedlagt fjervildt	
1	47	0	47
2	24	1	50
3	20	11	93
4	9	10	76
5	52	74	630
I alt	152	96	896

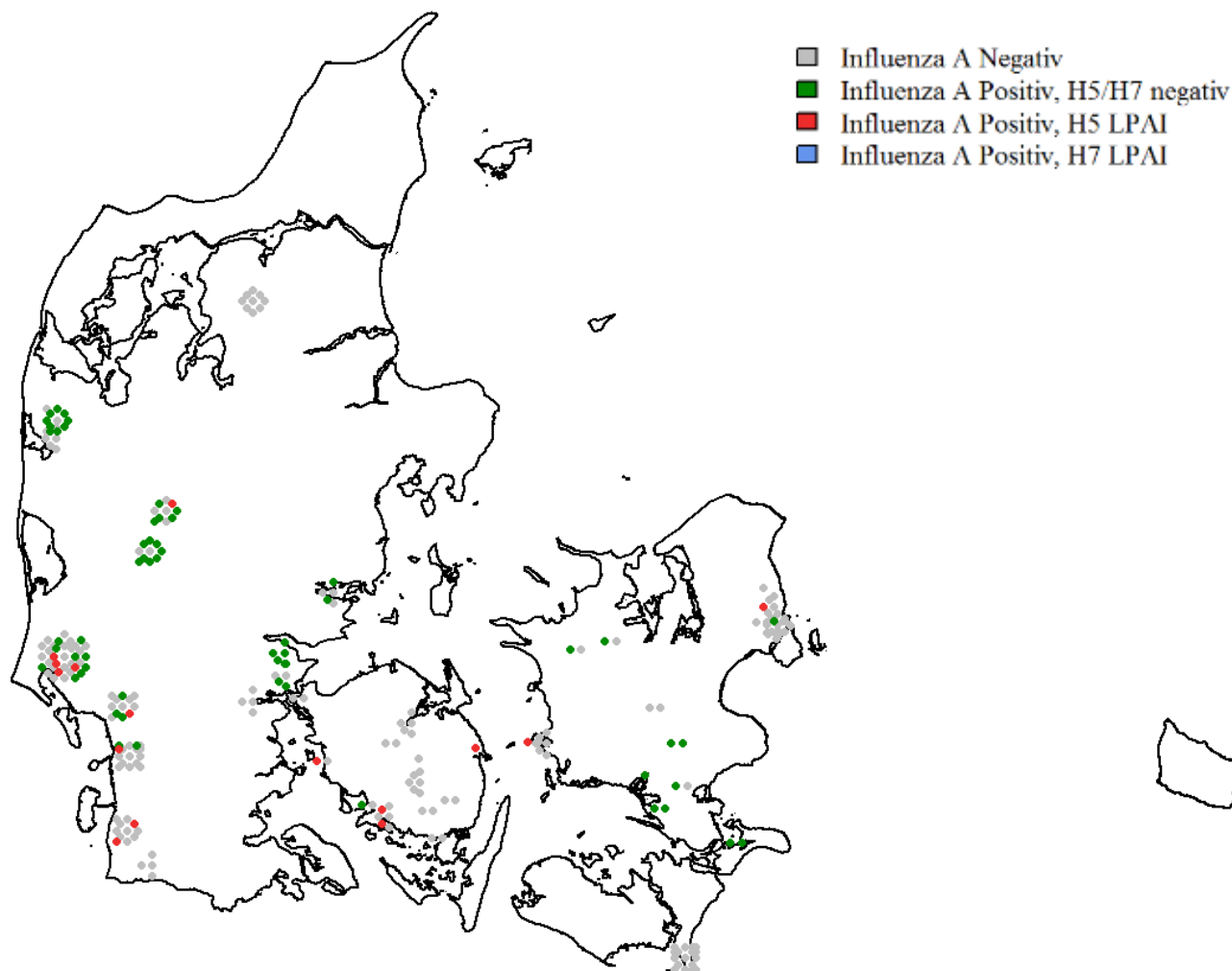
PCR resultater

De poolede prøver blev indledningsvist testet med PCR for influenza A virus. I alt var 73 pools positive, svarende til 29 % (tabel 4). De positive pools blev testet med specifikke subtypnings PCR metoder, for om de var H5 eller H7 subtyper. Heraf blev 15 pools subtypet og patogenicitetsbestemt ved sekventering til LPAI H5; der var ingen HPAI H5 positive pools, og der blev ikke påvist H7 virus. Antallet af de positive pools fordelte sig ligeligt på kategorierne "nedlagt fjervildt" og "levende fugle", men frekvensen af positive prøver var dobbelt så høj for nedlagt fjervildt som for levende fugle (tabel 4). Godt halvdelen af de undersøgte pools bestod af prøver fra gråænder, og de bidrog med 74 % af de positive pools.

Tabel 4. PCR resultater for de testede pools fra den aktive overvågning af AI 2017.

	I alt	Levende fugle (pools)	Nedlagt fjervildt (pools)	Gråænder (pools)
Antal pools	248	152	96	123 (56 %)**
AI PCR positiv	73 (29 %)	25	48	54 (74 %)**
H5 LPAI	15 (21 %)*	10	5	7 (50 %)**
H7 LPAI	0	0	0	0

*H5/H7 resultater er angivet i % af antal positive pools; **for gråænder er angivet % af hhv. antal pools, samt AI PCR og H5 LPAI positive pools.

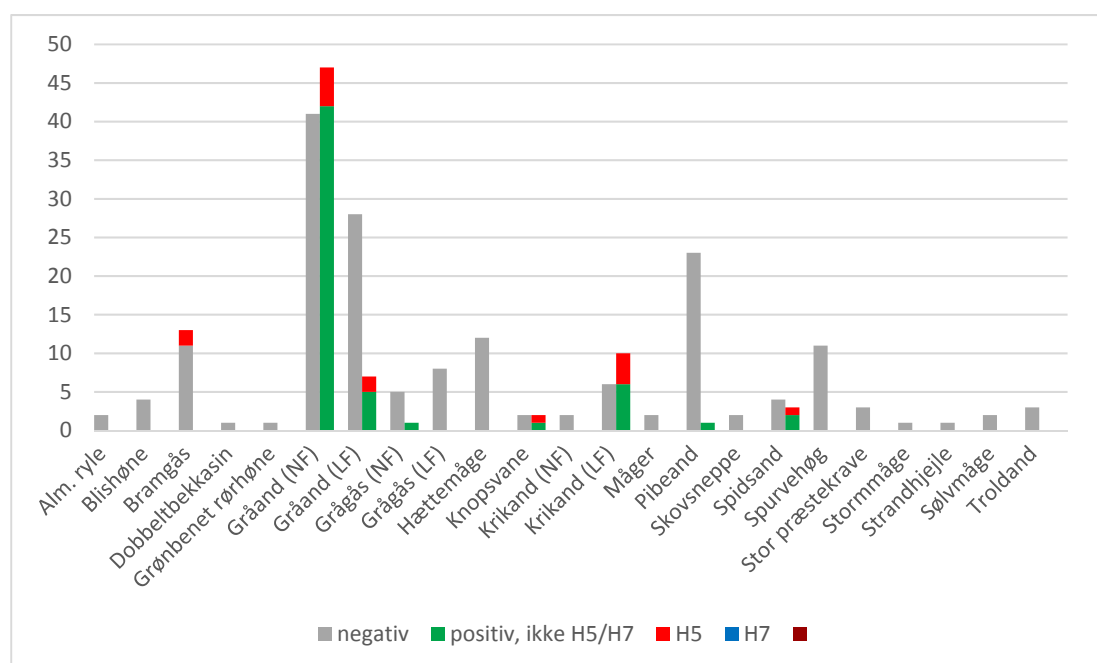


Figur 3. Geografisk fordeling på postnr.-niveau af prøver indsamlet i den aktive overvågning af AI i Danmark 2017. Hvert punkt repræsenterer en pool, som er distribueret i koncentriske cirkler med oprindelse i centrum af disse cirkler.

Prøverne blev indsamlet i Jylland, på Fyn, Lolland, Sjælland og herunder i Hovedstadsregionen. Der blev fundet influenzavirus i pools fra næsten alle landsdele (figur 3). Flest positive pools (n=55) var fra Jylland, hvor frekvensen af positive også var størst (38 %).

Der blev udtaget prøver i 1. kvartal og 3.-4. kvartal af 2017. Som nævnt var ingen af prøverne fra 1. kvartal positive for influenzavirus (bilag 2). Derimod var 44 % af pools fra 3. kvartal positive for influenzavirus (n=28), mens 26 % af pools fra 4. kvartal var positive (n=45). Der sås samme fordeling af positive pools i 2016, bortset fra at der i 3. kvartal kun var 13 % af poolsne der var positive.

De 73 pools, der var positive for influenzavirus, var alle fra fugle tilhørende ordenen andefugle (anseriformes). De positive pools var både fra svømmeænder (gråand, krikand, pibeand, spidsand) og fra underfamilien af svaner og gæs (knopsvane, bramgås, grågås). Gråænder stod for langt størstedelen af de positive pools (n=54), og halvdelen af de H5 virus positive pools var fra ænder (n=12) (figur 4). Resultatet er i overensstemmelse med både europæiske (Munster et al. 2007) og danske overvågningsresultater fra tidligere år (Hjulsager et al. 2012a,b) samt den generelt anerkendte opfattelse af andefugles (primært svømmefugles) rolle som de primære bærere af AI virus (Munster et al. 2007).



Figur 4. Prøvefordelingen udspecificeret på fugleart. Diagrammet angiver antal prøver (pools) fordelt på fugleart og AI PCR-resultatet på primærmateriale inkl. H5/H7 subtypning. NF=nedlagt fjervildt, LF=levende fugle.

Virusisolater

Hæmagglutinerende virus (virusisolater) kunne isoleres efter podning i embryonerede hønseæg fra 23 pools fra vilde fugle i den aktive overvågning, 14 var AI virus og 9 var avian paramyxovirus (PMV) (bilag 3). Isolater af H5N8 HPAI virus fra vilde fugle er ikke medregnet og molekylærgenetiske analyser af disse er ikke afsluttet pt.

Aviær influenza

Ved subtypning af AI virusisolaterne fra den aktive overvågning i vilde fugle blev der fundet virus med følgende subtyper: H3N8 (n=3), H4N6 (n=6), H6N1 (n=1), H6N2(n=1), H6N8 (n=1), H10N1 (n=1) og H10N7 (n=1) (Bilag 3). Alle isolaterne var fra svømmeænder, og subtypekombinationerne er før fundet i Danmark (Hjulsager et al. 2012b). Succesraten for isolation af AI virus var på niveau med de foregående år.

Paramyxovirus

Overvågningen var ikke rettet mod påvisning af paramyxovirus (PMV), og der blev derfor ikke foretaget en systematisk screening af alle prøver for PMV. Både AI virus og PMV er imidlertid hæmagglutinerende virus, derfor testes virusisolater, der ikke kan subtypes som AI virus, rutinemæssigt for PMV-1, og i de fleste tilfælde også for de øvrige PMV typer.

Der blev påvist PMV-1 virus i 6 pools, PMV-6 i 2 pools og PMV-8 virus i 1 pool. PMV-1 og PMV-6 er blandt de hyppigst påviste typer i de foregående år. Otte af ni PMV isolater var fra svømmeænder og et var fra bramgås (bilag 3). Det tyder på at svømmeænderne ofte er inficerede med paramyxovirus, og ænder betragtes da også som naturlig vært for de fundne PMV typer (Alexander, 2000b). Da andefugle både betragtes som naturlig vært for AI og PMV virus, er fundet af PMV i AI overvågningsprøverne forventet.

Prøver indeholdende flere virus

Subtypning af virus afslørede tilstedeværelsen af mere end et AI virus med forskellige subtyper i nogle pools. Fx var der en prøve, hvorfra der blev isoleret H6 virus i æg, men påvist H5 LPAI ved PCR og sekventering på primærmaterialet (bilag 3). Den aktive overvågning i vilde fugle er siden 2011 udført på poolede prøver, hvilket kan være en del af forklaringen på at der kan påvises flere virus i samme prøve. Men det er et naturligt forekommende fænomen, at fugle er inficeret med flere forskellige virus på samme tid (fx Dugan et al. 2008). Dette danner basis for dannelsen af virus reassortments, som er en udbredt mekanisme til evolution af AI virus, hvor nye AI virus dannes ved at gener fra forskellige virus blandes, når den samme celle er inficeret med forskellige virus.

Sammenligning med resultater fra tidligere år

Nøgletallene fra den aktive overvågning af AI i 2014-17 er angivet i tabel 5. Det var et krav at prøver der indgik i overvågningen blev modtaget indenfor 5 dage efter udtagelse. Målet på 900 fugle blev nået, og andelen og antallet af positive pools i 2017 var på niveau med de foregående år. Antallet og andelen af H5 positive var også på niveau med tidligere, og var basis for at vi igen i år kunne udføre en vurdering af egnetheden af de diagnostiske RT-PCR assays der anvendes til afklaring af AI mistanker (se afsnit om Molekylær karakterisering af AI virus) og fylogenetiske analyser til at belyse H5 diversiteten i danske vilde fugle. Andelen af pools, hvorfra der kunne isoleres virus, var på niveau med tidligere år.

Fuglearten/familien synes at være den afgørende faktor for sandsynligheden for indsamling af en AI virus positiv pool. Forskelle i indsamlingsstrategierne og deraf følgende håndtering af prøverne undervejs til laboratoriet synes af mindre betydning i denne sammenhæng. De anvendte indsamlingsmetoder har suppleret hinanden, således at overvågningen har indbefattet flere forskellige arter, samtidig med at der blev påvist relativt mange AI virus.

Tabel 5. Sammenligning af AI overvågning 2014-17 i vilde fugle, aktiv overvågning. PCR screenings-resultater på primærmateriale og succesrate for dyrkning af AI virus i æg.

	2014		2015		2016		2017	
	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]
Nedlagt fjervildt*	499	101	494	100	377	80	445	96
Levende fugle**	513	185	479	164	544	163	451	152
I alt	1012	286	973	264	921	243	896	248
PCR positive	-	50 (17 %)	-	72 (27 %)	-	50 (21 %)	-	73 (29 %)
H5 LPAI	-	5 (10 %)	-	20 (28 %)	-	12 (24 %)	-	15 (21 %)
H7 LPAI	-	3 (6 %)	-	1 (1 %)	-	1 (2 %)	-	0
AI VI positive	-	13 (26 %)	-	11 (15 %)	-	11 (22 %)	-	14 (19 %)

[#] Prøver er pools af 1-5 kloaksvabere udtaget fra samme art, på samme sted (postnr.) og tid. *Prøver fra nedlagt fjervildt er indsamlet på vildthåndteringsvirksomheder. **Prøver fra Levende fugle er indsamlet via SNM og er enten levende vilde fugle genudsat efter prøveudtagelse eller nedlagt ved jagt og samlet samme dag.

Molekylær karakterisering af AI virus

H5 evaluering af diagnostiske assays

EU referencelaboratoriet vurderede egnetheden af de diagnostiske RT-PCR assays til detektion af clade 2.2.4.4 HPAI H5N8 virus der cirkulerede i Europa siden oktober 2016, som værende god. I analysen indgik også det første danske virus, A/tufted duck/Denmark/17740-1/2016(H5N8). HPAI H5N8 indgår ikke i vores egen analyse af assay fitness, som i stedet er målrettet de LPAI H5 virus, der er udbredt i de danske fuglebestande.

Der blev udført fuldlængde HA sekventering på 12 pools fra den aktive overvågning i vilde fugle. Der blev ikke opnået fuldlængde sekvens på alle 12 pools, men for alle var der tilstrækkelig sekvens til at dække alle eller de fleste primer/probe regioner. Sekvenserne indgik i en assay fitness analyse (bilag 4), hvor de diagnostiske H5 RT-PCR assays blev evalueret. Til subtypning og patogenicitetsbestemmelse af H5 virus anvendes de EU anbefalede specifikke RT-PCR assays (Slomka et al. 2007a; Slomka et al. 2007b; Slomka et al. 2012) rutinemæssigt til AI diagnostik og overvågning på DTU-VET. Primer- og probesekvenserne for de tre H5 specifikke RT-PCR assays blev sammenlignet med de 12 LPAI H5 virussekvenser fra 2017, samt tilgængelige danske sekvenser fra 2012-2016.

For hvert RT-PCR assay blev H5 resultatet korreleret til pan influenza detektions assay resultatet ("AI-matrix" Ct-værdien). Der var blevet påvist LPAI H5 virus i prøver med en AI-matrix Ct-værdi på op til 36, hvilket er på niveau med detektionsgrænsen for AI-matrix assayet.

For det EU anbefalede "konventionel H5 KHA" assay, der anvendes til sekventering af kløvningsstedet for patogenicitetsbestemmelse, er der i alle sekvenser fra 2017-prøverne ét mismatch i hver af de 2 primere. Det er de samme mismatch, der er i alle sekvenserne, og de findes også i alle virus fra de tidligere år, hvoraf enkelte virus fra 2015 har yderligere 1-2 mismatches til primersekvenserne. Fitness for dette assay overfor 2017-virus er dermed den samme, eller bedre, som overfor de ældre H5 virus i analysen. Man kan overveje at opdatere dette assay til perfect match overfor 2017-virus, da samme mismatch trend nu er vist siden 2012.

For "H5" assayet, der er det EU anbefalede real-time assay til screening for H5 virus, er der 2-4 mismatches til den ene primer, og for et virus er der ydermere et mismatch til proben. Der ses en forskel på op til 7 Ct-værdier mellem AI-matrix og H5 Ct-værdierne. H5 virus i tre prøver fra 2017 bliver slet ikke detekteret med dette assay (H5 Ct=0), hvilket kan forklares af mismatches til primeren i kombination med et lavt indhold af virus (AI-matrix Ct= 32, 33, 36). Situationen er den samme for virus fra øvrige år, hvor der også var mange H5 virus positive prøver, der ikke kunne detekteres med dette assay. Det EU anbefalede H5 real-time screeningsassay er dermed ikke tilstrækkeligt sensitivt overfor nuværende cirkulerende virus, til at man kan forvente, at det kan påvise H5 virus i svagt positive prøver. På denne baggrund anvender DTU-VET dette assay til screening for H5 i kombination med "H5CS" real-time assayet, for at opnå en bedre sensitivitet.

"H5CS" real-time assayet, er ikke et officielt EU anbefalet assay, men EU referencelaboratoriet anbefaler det som real-time assay til sekventering af H5 kløvningsstedet til patogenicitetsbestemmelse. For 2017 prøverne ligger AI-matrix resultatet max 3 Ct-værdier højere end H5CS Ct-værdierne, der er dog typisk 2 mismatches til den ene primer og/eller 1 mismatch til den anden primer, men ingen mismatch til proben. Der er dermed god overensstemmelse til AI-matrix resultatet, og alle H5 virus detekteres af assayet. For prøverne fra de foregående år er der perfect match for næsten alle prøverne til både primere og probe, og forskellen i Ct til AI-matrix er typisk 0-1 Ct-værdi, eller ligefrem negativ (H5CS Ct < AI-matrix Ct). Der er således akkumuleret mismatches til primersekvenserne, og det er formodentligt det, der afspejles i den marginalt dårligere sensitivitet, der observeres overfor H5 i 2017-prøverne i sammenligning med prøverne fra de tidligere år.

Analysen indikerer at "H5CS" assayet er bedre egnet til sensitiv detektion af nuværende cirkulerende LPAI H5 virus, og at det er vigtigt at fortsætte overvågning af LPAI H5 virus evolutionen, med henblik på en eventuel opdatering af H5 real-time screeningsstrategien hvis trenden fortsætter. På DTU-VET anvender vi "H5CS" assayet til screening for H5 i kombination med "H5" real-time assayet, for at opnå en tilfredsstillende sensitivitet overfor cirkulerende H5 virus.

Analysen indikerede, at de assays, der anvendes til subtypning af H5, er anvendelige overfor de virus, der cirkulerer i Danmark i dag, på trods af den drift i sekvenserne, som afsløres af fuldlængde HA sekventeringen. Men analysen viste også, at det er nødvendigt med en strategi, der involverer samtidig anvendelse af både "H5" og "H5CS" real-time assays'ne for at opnå en sensitiv påvisning af LPAI H5 virus. Da de danske virus jo i første omgang er fanget af disse assay, er der naturligvis en bias i resultatet. Der er dog ikke fundet yderligere H5 virus ved subtypning af isolater og primærprøver, der ikke i første omgang var subtypet som H5, med de H5 specifikke RT-PCR assays. Det er også vigtigt at supplere med bevågenhed overfor fremkomst af nye virus i omkringliggende lande og resten af verden, særligt Euroasien, som de danske virusgener oftest udveksles med. Det kan være umuligt at designe et enkelt assay bestående af to primere og en probe, som sensitivt kan detektere alle varianter af H5. Det er derfor relevant at anvende flere assays i rutinediagnostikken for at opnå en bedre sensitivitet, ligesom det gøres i dag på DTU-VET, hvor vi rutinemæssigt altid anvender både "H5" og "H5CS" samtidigt til subtypning af H5. Fitness-analysen understreger vigtigheden af, at der foretages en løbende monitorering af drift i sekvenserne, så de anvendte assays kan opdateres ved behov. Da EU referencelaboratoriet sjældent har adgang til LPAI sekvenser fra vilde fugle i real-time, og da der endvidere kun sker en meget begrænset offentliggørelse af fund af H5/H7 LPAI virus i vilde fugle, kan EU referencelaboratoriet ikke udføre en fyldestgørende analyse af driften i H5/H7 virus. Det er derfor nødvendigt at vi holder øje med situationen under danske forhold med en fortsat overvågning af driften i H5/H7 virus, for på den måde at være i stand til at påvise H5/H7 virus med høj sensitivitet når der opstår mistanke om AI virus i danske fjerkræbesætninger.

H5 LPAI diversitet

Der blev udført fylogenetisk analyse af HA sekvenserne fra 11 LPAI H5 positive pools fra den aktive overvågning i 2017. Sekvenserne blev sammenlignet med sekvenser fra danske og udenlandske virus fra tidligere år, både fra vilde fugle og fjerkræ (figur 5).

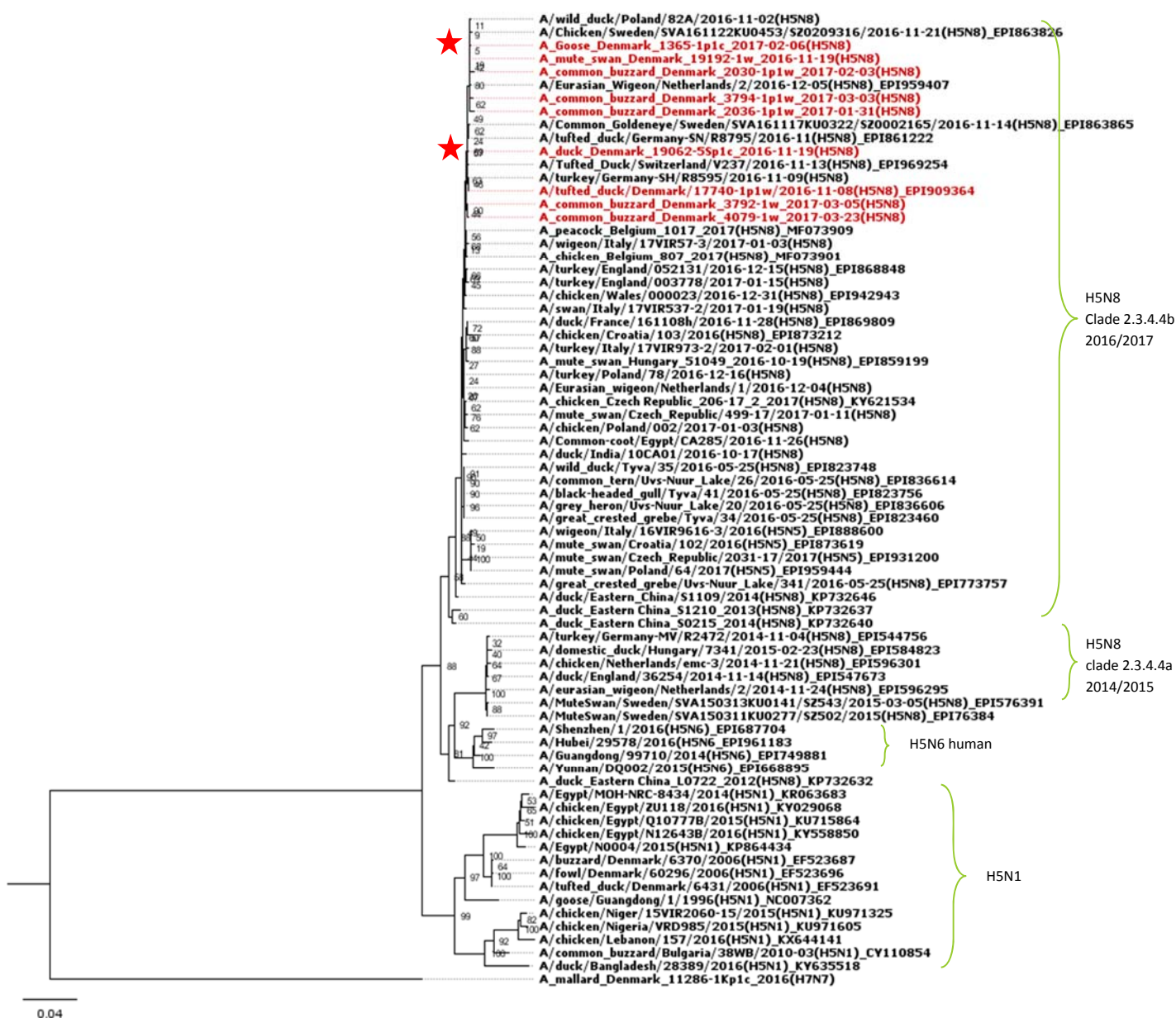
Den fylogenetiske analyse viser, at H5 generne fra prøverne fra 2017 er beslægtede med H5 gener fra virus i prøver fra vilde fugle, der blev indsamlet i Danmark i 2012-2016 (figur 5). Analysen afslører en betydelig genetisk drift i forhold til de tidligere år. Ti af de danske 2017-virus ligger desuden i deres eget lille cluster sammen med det nyeste LPAI H5 virus fra GISAID influenzavirus sekvensdatabasen (pr. 20. maj 2017), A/chicken/Scotland/532/2016(H5N1)_EPI687187. Der er kun få nyere H5 LPAI virussekvenser tilgængelige i databasen, de øvrige er 5 franske H5 virus, fx A/duck/France/160927/2016(H5N1)_EPI1153409, der er lidt fjernere beslægtede med de danske 2017-virussekvenser. En enkelt dansk H5 2017-virussekvens, A/mallard/Denmark/16246-46/2017-10-16(H5), ligger udenfor clusteret af de øvrige danske 2017-virussekvenser. Den er kun 95 % identiske med de øvrige 2017-virussekvenser over et område på 814 bp, mens de øvrige er mere end 98 % indbyrdes identiske i samme område af HA sekvensen. Prøven er udtaget samme sted og tid som fx A/mallard/Denmark/16246-47w/2017-10-16(H5), så der er ikke nogen umiddelbar epidemiologisk forklaring på dette, og det illustrer at diversiteten må formodes at være større end den vi finder, som følge af vores lave stikprøvestørrelse. Analysen er i overensstemmelse med den udbredte antagelse, at der cirkulerer forskellige grupper af virus blandt vilde fugle.



Figur 5. Fylogenetisk analyse af danske LPAI H5 gener fra vilde fugle og fjerkræ. Sekvenser fra H5 virus fra Danmark 2017 er med rød tekst. Træet er baseret på ca. 1500 bp fragment fra HA-genet. HPAI angiver højpatogen AI. w=vild fugl. c=kommercielt fjerkræ. ★PAI H5N2 fra udbrud af AI i farmede gråænder 2016.

H5 HPAI diversitet

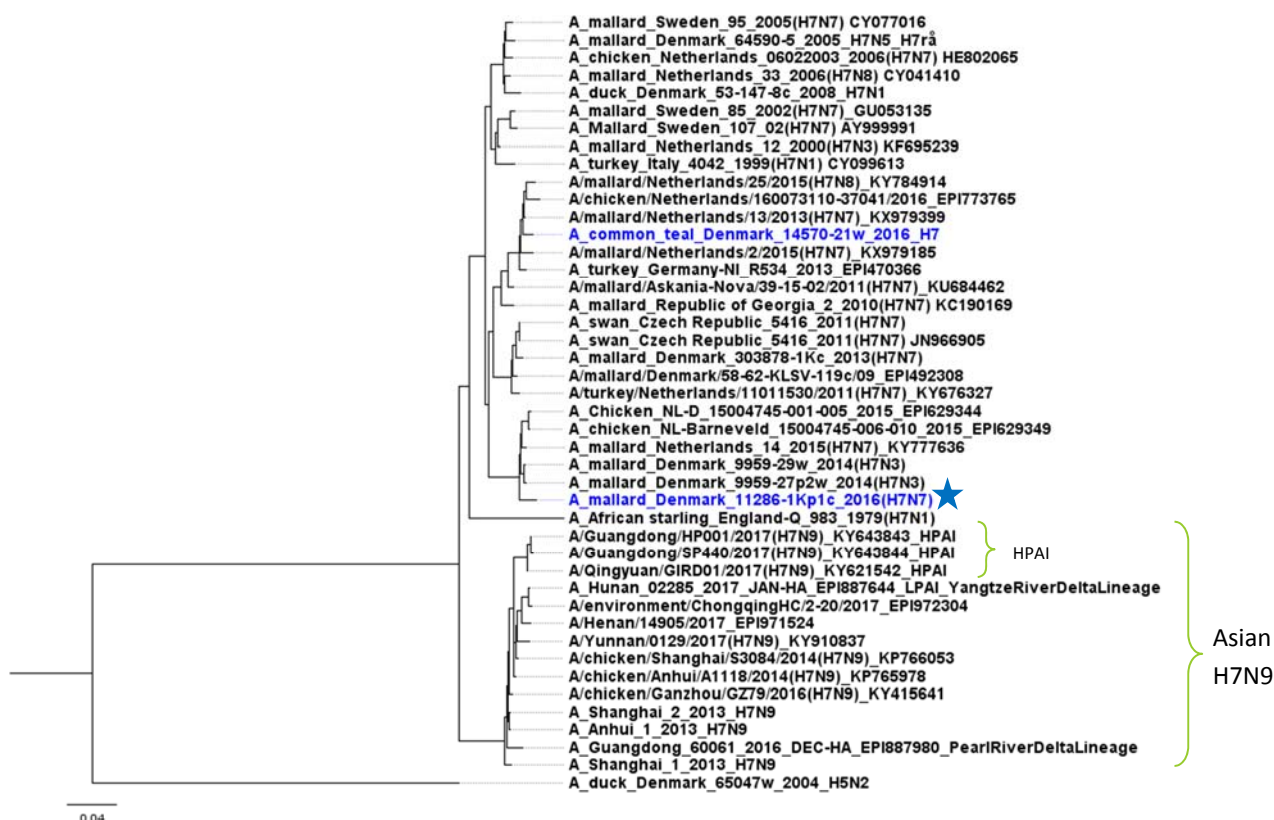
Der er udført fuldlængde sekventering af HA genet fra udvalgte virus fra vilde fugle og fra de to hidtil eneste fund af HPAI H5N8 virus i fjerkræ på dansk grund, hhv. en hobbybesætning ved Helsingør i november 2016, A/duck/Denmark/19062-5Sp1c/2016-11-19(H5N8), og i gæs fra et museum ved Maribo i februar 2017, A/goose/Denmark/1365-1p1c/2017-02-06(H5N8). Molekylærfylogenetisk analyse (figur 6) viste, at disse virus var nært beslægtede med hinanden og med samtidige HPAI H5 clade 2.2.4.4b virus fra andre europæiske lande. Virus adskilte sig imidlertid genetisk fra HPAI H5N8 fra vinteren 2014/2015 (clade 2.2.4.4a), hvor der var enkelte fund af HPAI i fjerkræ og/eller døde vilde fugle i England, Tyskland, Holland, Italien, Ungarn og Sverige. Virus adskilte sig ydermere fra H5N6 der har smittet mennesker i Asien, og fra virus i det foregående udbrud af HPAI i Danmark, hvor HPAI virus med subtype H5N1 var årsag til udbrud i vilde fugle i 2006. Yderligere analyser på fuldgenom sekvensdata af danske H5N8 HPAI virus pågår.



Figur 6. Fylogenetisk analyse af danske fuldlængde HPAI H5 gensekvenser fra vilde fugle. Sekvenser af H5 HPAI virus fra Danmark 2016/2017 er fremhævet med rød tekst. Træet er baseret på 1631 bp fragmenter fra HA-genet. ★ virus fra besætninger/fangenskab.

H7 diversitet

Der er ikke påvist H7 virus i 2017. De foregående år er der typisk fundet ganske få (ofte bare én) H7 LPAI viruspositiv prøve, så på den baggrund er det ikke overraskende at der ikke er påvist H7 virus i 2017. Fylogenetisk analyse af prøver fra de foregående år har vist at de danske H7 virus ikke er nært beslægtede med den humanpatogene H7N9 virus variant fra Asien, der kan smitte fra fugle til mennesker. Danske LPAI H7 virus fundet i vilde fugle og fjerkræ de senere år er imidlertid nært beslægtede med hinanden og med LPAI H7 virus fra øvrige Europa (figur 7).



Figur 7. Fylogenetisk analyse af danske LPAI H7 gener fra vilde fugle og fjerkræ. Virus fra Danmark 2016 er med blå tekst. w=vild fugl. c=kommercielt fjerkræ. Neighbour-Joining træ baseret på 1613 bp sekvenser. ★ = LPAI H7N7 fra udbrud af AI i farmede gråænder 2016.

LPAI H7 virus påvises med meget lavere frekvens end H5 LPAI virus i vilde fugle i Danmark. Ikke desto mindre er det netop H7 LPAI virus, der har givet anledning til flest udbrud i fjerkræ de senere år, senest i 2016 og før det i 2013, 2010 og 2008. Der sker tilsyneladende en udveksling af virus mellem vilde fugle og fjerkræ, idet de virus, der bliver fundet i fjerkræ, er nært beslægtede med virus fra vilde fugle i Danmark. Fylogenetisk analyse af tilgængelige danske H7 virus HA sekvenser indikerer et tæt slægtskab mellem virus i vilde fugle og virus fra udbrud i fjerkræ, i overensstemmelse med teorien om at virus introduceres til fjerkræ via vilde fugle.

H9 virus

Der er en stigende bevågenhed overfor AI virus med H9 subtypen, da denne subtype har opnået enzootisk udbredelse i flere dele af verden, herunder Kina og Mellemøsten, og også optræder i Europa. Der er ligeledes rapporter om, at H9N2 virus kan være mere patogene i fjerkræ end andre LPAI, og så har de også vist zoonotisk potentiale både ved smitte af H9N2 virus til mennesker, men især fordi H9N2 virus også menes at have doneret en del af generne til den humanpatogene LPAI Asian H7N9 virus, samt til HPAI H5N8.

Alle AI virusisolater fra overvågningen i vilde fugle 2017 er subtypet ved sekventering af HA og NA generne. Ingen AI virus isolater var H9 subtype (bilag 3). Baseret på HA sekvenserne, er de danske H9N2 virus, der tidligere er påvist, nærmest beslægtede med dem, der er fundet i vilde fugle i Skandinavien og landene omkring os. De er ikke tæt beslægtet med enzootisk forekommende H9N2 fra Asien.

AI virus i fjerkræ

Der har ikke været udbrud af LPAI H5 eller H7 virus i danske fjerkræbesætninger i 2017, hvilket da også er en relativt sjælden begivenhed.

I virologiske screening af rutine overvågningsprøver fra fjervildtopdræt i 2017 blev i alt undersøgt 274 indsendelser i 2017 (tabel 8); 228 af fasaner, 36 af gråænder, 10 af agerhøns. Hver indsendelse blev undersøgt for AI virus med PCR på en pool af kloaksvabere og på en pool af trachealsvabere fra 10 kadavere indsendt til DTU-VET. Formålet var at påvise LPAI H5/H7 virus, for at undgå udslip til den vilde fauna og for at undgå at disse skal udvikle sig til HPAI. Der blev påvist Influenza A virus i to indsendelser fra gråandepdræt. Disse var ikke H5/H7 subtype, og fra den ene kunne H4N6 virus isoleres.

Der har været 5 serologiske AI mistanker/laboratoriemistanker, hvor der er påvist H5 og/eller H7 antistoffer i rutineovervågningsprøver med HI-test ved reaktion med H5/H7 referenceantigener. I lighed med 2016, og på foranledning af EU, er influenza antistofpositive prøver testet overfor et ekstra H5 antigen, H5N8, som kan reagere med antistoffer udløst af infektion med H5N8 HPAI og beslægtede virus. H5N8-antigenet anvendes kun til ænder og gæs, da disse ikke kan forventes altid at udvise tydelige kliniske tegn på infektion med H5N8 HPAI viruset. Virusset er imidlertid ekstremt patogent for fjerkræ der tilhører galliformes ordenen, derfor er det ikke indiceret at teste disse med H5N8-antigenet.

En indsendelse var fra høns, en fra høns+fasan, 2 fra gråænder og en fra gråand+fasan. Disse blev undersøgt for tilstedeværelsen af cirkulerende AI virus ved virologisk undersøgelse med PCR på svaberprøver udtaget umiddelbart efter antistofpåvisningen. Influenza A virus kunne påvises i 2 tilfælde (besætning C og D, tabel 7). I en indsendelse fra gråand+fasan blev påvist H8 virus i fasanerne og avian euroasiatisk lineage H1N1 i gråænderne. I en indsendelse fra gråænder kunne virus ikke subtypes yderligere, end til at det ikke var H5 eller H7 subtype.

Til sammenligning var der i 2016 10 serologiske AI mistanker/laboratoriemistanker, fem indsendelser fra høns og fem fra gråandebesætninger. Influenza A virus blev påvist i 3 tilfælde, alle gråandeflokke. I den ene kunne virus subtypes til H10N4, mens de øvrige to ikke kunne subtypes yderligere end at de ikke var H5 eller H7 subtype. I 2015 var der to serologiske mistanker. En fra høns og en fra gråænder. Begge fik påvist AI antistoffer på baggrund af reaktion overfor H7 antigen i HI-test. Der kunne ikke påvises Influenza A virus i opfølgende mistanke svaberprøver.

I 2016 kunne en del af forklaringen på de mange seropositive indsendelser søges i tre gentagne indsendelser fra den samme seropositive flok i hhv. april, juli og august 2016, og i tre indsendelser hvor prøverne kun reagerede overfor det nyimplementerede H5N8 antigen, hvortil der ikke forefandtes tilgængeligt sekundært antigen til at udelukke reaktion baseret på N-typen (HxN8). De fem indsendelser med reaktioner overfor H5/H7 antigener er alle fra besætninger med forskellige CHR.-numre og der er ikke tilsvarende forklaring på antallet som i 2016.

Årsager til fund af flere H5/H7 seropositive indsendelser end i 2015, såfremt dette overhovedet kan siges at være en signifikant stigning, kan være en øget eksponering af flokkene i overvågningsprogrammet for H5/H7 virus, fx hvis der flourerer mere H5/H7 virus i den vilde fauna, eller som følge af en stigning i andelen af overvågede flokke med adgang til udearealer (økologiske og fritgående høns). En anden årsag kan være en ændring af cirkulerende virus, fx i vilde fugle, til varianter, der kan krydsreagere med de anvendte H5/H7 antigener, der udvælges af EU referencelaboratoriet.

Der er påvist AI virus i en klinisk mistanke i gæs af kategorien ”andre fugle i fangenskab”. Virus var HPAI H5N8, og fylogenetiske analyser viste det var beslægtet med samtidige fund af HPAI i vilde fugle i Danmark (figur 6).

Tabel 7. AI virus positive indsendelser fra fjerkræbesætninger i 2017.

Besætnings-ID	Indsendelse	Udtagelsesdato for svaberprøver	Fugleart	Indsendelsesårsag	virus	AI positiv prøve
A	17-8746	12.06.2017	Gråand	Fjervildt	Ikke H5/H7	K+S
B	17-8001	30.05.2017*	Gråand	Fjervildt	H4N6 (K)	K+S (isolat fra K)
C	17-3611	23.02.2017	Fasan Gråand	Antistofpåvisning	H8 H1N1	S (fasan) K (gråand)
D	17-4161	02.03.2017	Gråand	Antistofpåvisning	Ikke H5/H7	
E	17-1365	06.02.2018	Gæs	Klinisk mistanke, andre fugle i fangenskab	H5N8 HPAI	KS pools

K=kloaksvaber; S=trachealsvaber/svælgsvaber (der er undersøgt både K og S fra hver indsendelse). KS pool er pool af K og S fra det samme dyr.

Indsendelsesårsag, fjervildt er fra den virologiske overvågning i fjerkræ; Antistofpåvisning er i forbindelse med den serologiske AI fjerkræovervågning. *modtagelsesdato, da udtagelsesdato ikke var oplyst.

Tabel 8. Oversigt over antal indsendelser til den virologiske overvågning af opdrættet fjervildt i perioden 2006-2017. Modificeret fra Hjulsager et al. 2012b.

Indsendelser	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Antal	ca. 250	395	362	333	307	258	272	267	255	256	260	274
AI virus positive	7	2	4	7	0	4	0	3	6	2	4	2
AI H5/H7*	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0

*alle er LPAI.

Referencer

- Alexander, D.J., 2007. An Overview of the Epidemiology of Avian Influenza. *Vaccine* 25, 5637-5644.
- Alexander, D.J., 2000a. A Review of Avian Influenza in Different Bird Species. *Vet. Microbiol.* 74, 3-13.
- Alexander, D.J., 2000b. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.*, 19 (2), 443-462.
- Arnold, M., Slomka, M., Breed, A., Hjulsgager, C., Prits-Verschuren, S., Venema-Kemper, S., Bouwstra, R., Trebbien, R., Zohari, S., Ceeraz, V., Larsen, L., Manvell, R., Koch, G., Brown, I., 2017. Evaluation of ELISA and haemagglutination inhibition as screening tests in serosurveillance for H5/H7 avian influenza in commercial chicken flocks. *Epidemiology & Infection*, accepted.
- Banks, J., Speidel, E.S., Moore, E., Plowright, L., Piccirillo, A., Capua, I., Cordioli, P., Fioretti, A., Alexander, D.J., 2001. Changes in the Haemagglutinin and the Neuraminidase Genes Prior to the Emergence of Highly Pathogenic H7N1 Avian Influenza Viruses in Italy. *Arch. Virol.* 146, 963-973.
- Capua, I., Alexander, D.J., 2007. Animal and Human Health Implications of Avian Influenza Infections. *Biosci. Rep.* 27, 359-372.
- Cattoli, G., Fusaro, A., Monne, I., Capua, I., 2009. H5N1 Virus Evolution in Europe—An Updated Overview. *Viruses* 2009, 1, 1351-1363. *Viruses* 1, 1351-1363.
- Dugan, V.G., Chen, R., Spiro, D.J., Sengamalay, N., Zaborsky, J., et al. (2008) The Evolutionary Genetics and Emergence of Avian Influenza Viruses in Wild Birds. *PLoS Pathog* 4(5): e1000076.
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelswaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D., 2005. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) obtained from Black-Headed Gulls. *J. Virol.* 79, 2814-2822.
- Fuller, C.M., Collins, M.S., Alexander, D.J., 2009. Development of a real-time reverse-transcription PCR for the detection and simultaneous pathotyping of Newcastle disease virus isolates using a novel probe. *Arch. Virol.* 154, 929-937.
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., Kawaoka, Y., 2001. Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses. *Science* 293, 1840-1842.
- Hjulsgager, C.K., Breum, S.Ø., Trebbien, R., Handberg, K.J., Therkildsen, O.R., Madsen, J.J., Thorup, K., Baroch, J.A., DeLiberto, T.J., Larsen, L.E., Jørgensen, P.H., 2012a. Surveillance for Avian Influenza Viruses in Wild Birds in Denmark and Greenland, 2007-10. *Avian Dis.* 56, 992-998.
- Hjulsgager, C.K., Breum, S.Ø., Trebbien, R., Larsen, L.E., Therkildsen, O.R., Madsen, J.J., Thorup, K., Handberg, K.J., Jørgensen, P.H., 2012b. Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2003-2011. Rapport, 2.udgave pr. 10, juni 2014.
- Hjulsgager, C.K., Krog, J.S., Breum, S.Ø., Trebbien, R., Larsen, L.E., 2013. Molekylær karakterisering af influenzavirus fra vilde fugle i Danmark i 2012. Rapport, 31.12.2013..
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virology* 146, 2275-2289.
- Keawcharoen, J., van Riel, D., van Amerongen, G., Bestebroer, T., Beyer, W.E., van Lavieren, R., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., Kuiken, T., 2008. Wild Ducks as Long-Distance Vectors of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.* 14, 600-607.

- Munster, V.J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenstrom, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G.F., Beyer, W., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A., Fouchier, R., 2007. Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. *PLoS Pathog* 3, 630-638.
- Munster, V.J., Fouchier, R.A.M., 2009. Avian Influenza Virus: Of Virus and Bird Ecology. *Vaccine* 27, 6340-6344.
- Sims, L., Khomenko, S., Kamata, A., Belot, G., Bastard, J., Palamara, E., Bruni, M., von Dobschuetz, S., Dauphin, G., Raizman, E., Lubroth, J., 2016. H5N8 highly pathogenic avian influenza (HPAI) of clade 2.3.4.4 detected through surveillance of wild migratory birds in the Tyva Republic, the Russian Federation – potential for international spread. *Emerg. Infect. Dis.* 35, 1-8.
- Slomka, M.J., Coward, V.J., Banks, J., Löndt, B.Z., Brown, I.H., Voermans, J., Koch, G., Handberg, K.J., Jørgensen, P.H., Cherbonnel-Pansart, M., Jestin, V., Cattoli, G., Capua, I., Ejdersund, A., Thorén, P., Czifra, G., 2007a. Identification of Sensitive and Specific Avian Influenza Polymerase Chain Reaction Methods Through Blind Ring Trials Organized in the European Union. *Avian Dis.* 51, 227-234.
- Slomka, M.J., Pavlidis, T., Banks, J., Shell, W., McNally, A., Essen, S., Brown, I.H., 2007b. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. *Avian Dis.* 51, 373-377.
- Slomka, M.J., To, T.L., Tong, H.H., Coward, V.J., Hanna, A., Shell, W., Pavlidis, T., Densham, A.L.E., Kargiolakis, G., Arnold, M.E., Banks, J., Brown, I.H., 2012. Challenges for accurate and prompt molecular diagnosis of clades of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses emerging in Vietnam. *Avian Pathol.* 41, 177-193.
- Slomka, M.J., Hanna, A., Mahmooda, S., Govil, J., Krill, D., Manvell, R.J., Shell, W., Arnold, M.E., Banks, J., Brown, I.H., 2013. Phylogenetic and molecular characteristics of Eurasian H9 avian influenza viruses and their detection by two different H9-specific RealTime reverse transcriptase polymerase chain reaction tests. *Vet. Microbiol.* 162, 530-542.
- Stech, O., Veits, J., Weber, S., Deckers, D., Schröder, D., Vahlenkamp, T.W., Breithaupt, A., Teifke, J., Mettenleiter, T.C., Stech, J., 2009. Acquisition of a Polybasic Hemagglutinin Cleavage Site by a Low-Pathogenic Avian Influenza Virus is Not Sufficient for Immediate Transformation into a Highly Pathogenic Strain. *J. Virol.* 83, 5864-5868.
- Verhagen, J.H., Munster, V.J., Fouchier, R.A.M., 2011. 28 - Ecology and Evolution of Avian Influenza Viruses. *Genetics and Evolution of Infectious Disease*. Elsevier, London, pp. 729-749.
- Yang, J.-R., Liu, M.-S., 2017. Human infection caused by an avian influenza A (H7N9) virus with a polybasic cleavage site in Taiwan, 2017. *J. Formosan Med. Ass.* 116, 210-212.

Bilag 1. Oversigt over den passive overvågning

AI 2017 – passiv overvågning

Kategori	Tilstand	Art	VET sagsnr.	Kommune	Indsamlingsdato	Resultat
FVST	Død	Knopsvane	17-00159-01	Norddjurs	01-01-2017	Negativ
FVST	Død	Havørn	17-03972-01	Ringkøbing-Skjern	02-01-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Solsort	17-00158-01	Horsens	04-01-2017	Negativ
FVST	Død	Havørn	17-00168-01	Haderslev	07-01-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Spurvehøg	17-00251-01	Favrskov	08-01-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-00187-01	Lolland	09-01-2017	Negativ
FVST	Død	Husskade	17-00252-01	Gribskov	09-01-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-00290-01	Ringkøbing-Skjern	09-01-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-02910-01	Vordingborg	11-01-2017	Negativ
FVST	Død	Tårnfalk	17-01205-01	Guldborgsund	14-01-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-01204-01	Furesø	15-01-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-01206-01	Lemvig	16-01-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-01370-01	Aabenraa	19-01-2017	Negativ
FVST	Død	Hættemåge	17-01904-01	Aarhus	20-01-2017	Negativ
FVST	Død	Havørn	17-03973-01	Tønder	20-01-2017	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	17-00293-01	Næstved	23-01-2017	Negativ
FVST	Død	Pibeand	17-01327-01	Aarhus	23-01-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Knopsvane	17-01905-01	Næstved	23-01-2017	Negativ
FVST	Død	Fiskehejre	17-01369-01	Aarhus	24-01-2017	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	17-01127-01	Odder	25-01-2017	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	17-01128-01	Vejle	25-01-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-01328-01	Guldborgsund	25-01-2017	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	17-01329-01	Guldborgsund	25-01-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-01330-01	Guldborgsund	25-01-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-01368-01	Guldborgsund	25-01-2017	Negativ
FVST	Død	Gråkrage	17-02122-01	Sorø	25-01-2017	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	17-02123-01	Køge	25-01-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-02124-01	Kalundborg	25-01-2017	H5 LPAI
FVST	Død	Duehøg	17-01332-01	Bornholm	26-01-2017	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	17-01361-01	Horsens	26-01-2017	Negativ
FVST	Død	Råge	17-01362-01	Skanderborg	26-01-2017	Negativ
FVST	Død	Gråand	17-02121-01	Rødovre	26-01-2017	Negativ
FVST	Død	Råge	17-01331-01	Gribskov	27-01-2017	Negativ
FVST	Død	Råge	17-01363-01	Svenborg	28-01-2017	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	17-02041-01	Næstved	28-01-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-02045-01	Næstved	28-01-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-02046-01	Næstved	28-01-2017	Negativ
FVST	Død	Duehøg	17-02037-01	Ringsted	29-01-2017	Negativ
FVST	Død	Fiskehejre	17-02038-01	Stevns	29-01-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-02043-01	Guldborgsund	29-01-2017	Negativ
FVST	Død	Grågås	17-02033-01	Kalundborg	31-01-2017	Negativ
FVST	Død	Bramgås	17-02034-01	København	31-01-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-02036-01	Guldborgsund	31-01-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Husskade	17-02039-01	Næstved	31-01-2017	Negativ
FVST	Død	Gråkrage	17-02040-01	Odsherred	31-01-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-02044-01	Vordingborg	31-01-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-02042-01	Faabor-Midtfyn	01-02-2017	Negativ
FVST	Død	Gråand	17-01366-01	Bornholm	02-02-2017	Negativ
FVST	Død	Gråand	17-01367-01	Bornholm	02-02-2017	Negativ
FVST	Død	Gråand	17-02126-01	Bornholm	02-02-2017	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	17-02188-01	Nyborg	02-02-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-02030-01	Guldborgsund	03-02-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Duehøg	17-02031-01	Halsnæs	03-02-2017	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	17-02128-01	Randers	03-02-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-02302-01	Vejen	04-02-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-02303-01	Vejen	04-02-2017	Negativ
FVST	Død	Skarv	17-02031-01	Kalundborg	08-02-2017	Negativ
FVST	Død	Sortkrage	17-02193-01	Skanderborg	10-02-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-02851-01	Faxe	10-02-2017	Negativ

FVST	Død	Fiskehejre	17-02881-01	Slagelse	11-02-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-02192-01	Kalundborg	12-02-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Råge	17-02878-01	Rudersdal	12-02-2017	Negativ
FVST	Død	Fiskehejre	17-02879-01	Holbæk	12-02-2017	Negativ
FVST	Død	Vandrefalk	17-02890-01	Holstebro	12-02-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Blishøne	17-02889-01	Høje Taastrup	13-02-2017	Negativ
FVST	Død	Slørugle	17-02855-01	Tønder	15-02-2017	Negativ
FVST	Død	Tårnfalk	17-02888-01	Skanderborg	15-02-2017	Negativ
FVST	Død	Fiskehejre	17-02854-01	Thisted	16-02-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-03353-01	Holbæk	17-02-2017	Negativ
FVST	Død	Fiskehejre	17-02972-01	Vordingborg	18-02-2017	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	17-02976-01	Vordingborg	18-02-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-02979-01	Hillerød	19-02-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-03007-01	Høje Taastrup	19-02-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-02975-01	Næstved	20-02-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-02977-01	Høje Taastrup	20-02-2017	Negativ
FVST	Død	Gråand	17-02978-01	Odense	20-02-2017	Negativ
FVST	Død	Tårnfalk	17-03354-01	Dragør	20-02-2017	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	17-03008-01	Viborg	22-02-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-03483-01	Helsingør	28-02-2017	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	17-03484-01	Vordingborg	28-02-2017	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	17-03527-01	Horsens	02-03-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-03510-01	Holbæk	03-03-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-03794-01	Lemvig	03-03-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Musvåge	17-03792-01	Næstved	05-03-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Pibeand	17-03357-01	Aarhus	06-03-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-03511-01	Holbæk	06-03-2017	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	17-03963-01	Vejle	08-03-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-03969-01	Thisted	09-03-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-03962-01	Skanderborg	10-03-2017	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	17-03964-01	Viborg	10-03-2017	Negativ
FVST	Død	Duehøg	17-03974-01	Rebild	11-03-2017	Negativ
FVST	Død	Duehøg	17-03966-01	Struer	12-03-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-03971-01	Dragør	12-03-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-04030-01	Syddjurs	12-03-2017	Negativ
FVST	Død	Svartbag	17-03965-01	Langeland	13-03-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Svartbag	17-03967-01	Langeland	13-03-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Svartbag	17-03968-01	Langeland	13-03-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Skarv	17-03970-01	Aabenraa	13-03-2017	Negativ
FVST	Død	Sule	17-03975-01	Tønder	13-03-2017	Negativ
FVST	Død	Ederfugl	17-04031-01	Ærø	15-03-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Sølvmåge	17-04767-01	Ærø	15-03-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Natugle	17-04819-01	Mariagerfjord	18-03-2017	Negativ
FVST	Død	Sortand	17-04078-01	Allerød	19-03-2017	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	17-04820-01	Brønderslev	19-03-2017	Negativ
FVST	Død	Skovhornugle	17-04812-01	Aarhus	20-03-2017	Negativ
FVST	Død	Skovhornugle	17-48180-01	Aarhus	20-03-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-04076-01	København	21-03-2017	Negativ
FVST	Død	Blishøne	17-04817-01	Kalundborg	21-03-2017	Negativ
FVST	Død	Duehøg	17-04080-01	Lolland	22-03-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-04079-01	Næstved	23-03-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Musvåge	17-04836-01	Ringsted	26-03-2017	Negativ
FVST	Død	Grågås	17-04837-01	København	26-03-2017	Negativ
FVST	Død	Agerhøne	17-04838-01	Vejle	27-03-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-04916-01	Struer	27-03-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Måge	17-04814-01	Bornholm	28-03-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-04815-01	Frederikssund	28-03-2017	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	17-04918-01	Horsens	28-03-2017	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	17-04919-01	Slagelse	31-03-2017	Negativ
FVST	Død	Tårnfalk	17-04920-01	Hørsholm	02-04-2017	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	17-05050-01	Holstebro	04-04-2017	Negativ
FVST	Død	Havørn	17-05080-01	Nordfyns	04-04-2017	H5N8 HPAI
FVST	Død	Havørn	17-05081-01	Aalborg	07-04-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-05082-01	Esbjerg	20-04-2017	Negativ
FVST	Død	Råge	17-06153-01	Frederikshavn	24-04-2017	Negativ

FVST	Død	Råge	17-06152-01	Aarhus	26-04-2017	Negativ
FVST	Død	Grågåse	17-06154-01	Tårnby	30-04-2017	Negativ
FVST	Død	Huskskade	17-06155-01	Tårnby	03-05-2017	Negativ
FVST	Død	Måge	17-06806-01	Køge	03-05-2017	Negativ
FVST	Død	Huskskade	17-06728-01	Thisted	07-05-2017	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	17-06747-01	Faxe	07-05-2017	Negativ
FVST	Død	Natugle	17-07778-01	Ikast-Brande	21-05-2017	Negativ
FVST	Død	Vandrefalk	17-09430-01	Bornholm	26-05-2017	Negativ
FVST	Død	Vandrefalk	17-09430-02	Bornholm	26-05-2017	Negativ
FVST	Død	Vandrefalk	17-09430-03	Bornholm	26-05-2017	Negativ
FVST	Død	Tårnfalk	17-09120-01	Varde	05-06-2017	Negativ
Faldvildt	Død	Rød glente	17-09426-01	Silkeborg	16-06-2017	Negativ
Faldvildt	Død	Rød glente	17-09426-02	Silkeborg	16-06-2017	Negativ
FVST	Død	Råge	17-07725-01	Aarhus	26-06-2017	Negativ
Faldvildt	Død	Tårnfalk	17-09828-01	Assens	02-07-2017	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	17-09794-01	Silkeborg	13-07-2017	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	17-09780-01	Aarhus	16-08-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-13232-01	Ballerup	04-09-2017	Negativ
Faldvildt	Død	Havørn	17-14314-01	Lolland	07-09-2017	Negativ
Faldvildt	Død	Gråand	17-13980-01	Langeland	09-09-2017	Ikke H5/H7
Faldvildt	Død	Gråand	17-13980-02	Langeland	09-09-2017	Ikke H5/H7
Faldvildt	Død	Gråand	17-13980-03	Langeland	09-09-2017	Ikke H5/H7
Faldvildt	Død	Gråand	17-13980-04	Langeland	09-09-2017	Ikke H5/H7
Faldvildt	Død	Knopsvane	17-14312-01	Gadsaxe	16-09-2017	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	17-14838-01	Aalborg	25-09-2017	Negativ
Faldvildt	Død	Vandrefalk	17-15457-01	Thisted	26-09-2017	Negativ
FVST	Død	Fløjlsand	17-17216-01	Norrdjurs	31-10-2017	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	17-18051-01	Thisted	18-11-2017	Negativ
Faldvildt	Død	Knopsvane	17-18067-01	Lyngby-Taarbæk	23-11-2017	Negativ
FVST	Død	Musvåge	17-20099-01	Holbæk	20-12-2017	Negativ

Faldvildt: indsendt af borgere eller Veterinærenhed, der foretages undersøgelser udover AI i regi af Center for Vildtsundhed.

FVST: mistanke om AI indsendt/visiteret af FVST.

Bilag 2. Oversigt over den aktive overvågning

AI 2017 – aktiv overvågning

Kvartal	Lokalitet	Fangst metode	Dyreart	Antal pools	Antal fugle	AI virus positive pools	H5 LPAI positive pools	H7 LPAI positive pools	AI virus isolater
1	KBH	Levende	Gråand	2	8	0	0	0	
1	KBH	Levende	Hættemåge	2	8	0	0	0	
1	KBH	Levende	Måger	2	2	0	0	0	
1	KBH	Levende	Stormmåge	1	3	0	0	0	
1	KBH	Levende	Sølvmåge	1	4	0	0	0	
1	KBH	Levende	Troldand	2	6	0	0	0	
3	Sjælland	Levende	Almindelig ryle	2	2	0	0	0	
3	Sjælland	Nedlagt	Gråand	8	32	3	1	0	
3	Sjælland	Levende	Spurvehøg	7	19	0	0	0	
3	Sjælland	Levende	Stor præstekrave	2	4	0	0	0	
3	Fyn	Levende	Gråand	1	3	0	0	0	
3	Fyn	Nedlagt	Gråand	2	8	0	0	0	
3	Fyn	Levende	Krikand	1	1	0	0	0	
3	Jylland	Levende	Dobbeltbekkasin	1	1	0	0	0	
3	Jylland	Levende	Gråand	8	30	5	0	0	H4N6
3	Jylland	Nedlagt	Gråand	20	100	16	0	0	6 x H4N6
3	Jylland	Levende	Grågås	3	11	0	0	0	
3	Jylland	Levende	Krikand	6	22	4	0	0	H3N8
3	Jylland	Levende	Pibeand	3	5	0	0	0	
4	KBH	Levende	Blishøne	1	1	0	0	0	
4	KBH	Levende	Gråand	9	16	1	1	0	
4	KBH	Levende	Grågås	1	1	0	0	0	
4	KBH	Levende	Hættemåge	6	15	0	0	0	
4	KBH	Levende	Knopsvane	3	4	1	0	0	
4	KBH	Levende	Sølvmåge	1	1	0	0	0	
4	KBH	Levende	Troldand	1	4	0	0	0	
4	Sjælland	Levende	Bramgås	3	15	0	0	0	
4	Sjælland	Nedlagt	Gråand	9	35	8	0	0	H10N7
4	Sjælland	Levende	Grågås	3	15	0	0	0	
4	Sjælland	Levende	Spurvehøg	4	11	0	0	0	
4	Sjælland	Levende	Stor præstekrave	1	2	0	0	0	
4	Sjælland	Levende	Strandhjejle	1	1	0	0	0	
4	Fyn	Levende	Blishøne	3	4	0	0	0	
4	Fyn	Levende	Grønbenet rørhøne	1	1	0	0	0	
4	Fyn	Levende	Gråand	7	15	0	0	0	
4	Fyn	Nedlagt	Gråand	16	75	4	3	0	
4	Fyn	Levende	Hættemåge	1	2	0	0	0	
4	Fyn	Levende	Knopsvane	1	3	1	1	0	
4	Jylland	Levende	Bramgås	10	49	2	2	0	
4	Jylland	Levende	Gråand	8	15	1	1	0	
4	Jylland	Nedlagt	Gråand	33	162	16	1	0	2 x H3N8
4	Jylland	Levende	Grågås	1	1	0	0	0	
4	Jylland	Nedlagt	Grågås	6	27	1	0	0	H10N1
4	Jylland	Levende	Hættemåge	3	9	0	0	0	
4	Jylland	Levende	Krikand	9	30	6	4	0	H6N1
4	Jylland	Nedlagt	Krikand	2	6	0	0	0	
4	Jylland	Levende	Pibeand	21	78	1	0	0	
4	Jylland	Levende	Skovsneppe	2	8	0	0	0	
4	Jylland	Levende	Spidsand	7	21	3	1	0	H6N2
Ialt				248	896	73	15	0	14

Lokalitet: KBH, Hovedstadsområdet postnr. 1xxx, 2xxx; Sjælland, postnr. 3xxx, 4xxx; Fyn, postnr. 5xxx; Jylland, postnr. 6xxx, 7xxx, 8xxx, 9xxx.

Fangstmetode: Nedlagt, nedlagt fjervildt fra vildthåndteringsvirksomheder; Levende, levende ved prøveudtagelse eller skudt ved jagt umiddelbart forinden.

H5 og H7 LPAI er påvist ved PCR subtypning og HA kløvningssite sekventering.

AI virusisolater er virus, der er isoleret i æg og subtypet ved HI-test/N-test og eller sekventering af HA og NA fra virusisolaterne.

Bilag 3. Virusisolatoversigter

Virus isolater fra den passive og aktive AI overvågning, fjervildtopdræt-overvågningen og AI mistanker 2017. Subtype af isolater er fundet ved HI- og N- test og/eller sekventering. Subtype på originalmateriale er fundet ved PCR og/eller sekventering.

H-type	subtype	Art	Prøve-id	AI subtype på originalmateriale
H1	H1N1	Gråand ^c	17-3611-8	H1N1
H3	H3N8	Gråand	17-15467-53	Ikke H5/H7
	H3N8	Gråand	17-15467-54	Ikke H5/H7
	H3N8	Krikand	17-14701-15	Ikke H5/H7
H4	H4N6	Gråand	17-13660-15	Ikke H5/H7
	H4N6	Gråand	17-13996-26	Ikke H5/H7
	H4N6	Gråand	17-13996-27	Ikke H5/H7
	H4N6	Gråand	17-13996-28	Ikke H5/H7
	H4N6	Gråand	17-13996-29	Ikke H5/H7
	H4N6	Gråand	17-13997-29	Ikke H5/H7
	H4N6	Gråand ^c	17-8001-1K	Ikke H5/H7
H5	H5N8 HPAI	Gæs ^c	17-1365-1	H5N8 HPAI
	H5N8 HPAI	Musvåge	17-2030-1	H5N8 HPAI
	H5N8 HPAI	Musvåge	17-2036-1	H5N8 HPAI
	H5N8 HPAI	Musvåge	17-3794-1	H5N8 HPAI
H6	H6N1	Krikand	17-14704-20	H5 LPAI
	H6N2	Spidsand	17-15393-12	Ikke H5/H7
	H6N8	Gråand	17-13996-30	Ikke H5/H7
H10	H10N1	Grågås	17-17737-53	Ikke H5/H7
	H10N7	Gråand	17-17735-40	Ikke H5/H7

w=vild fugl; c=fjervildtopdræt eller fra AI mistanke i fjerkræ eller fugle i fangenskab.

Virus fra overvågningen i vilde fugle 2017 der er isoleret i æg og som ikke var influenza A virus. Typning af PMV isolater med HI-test, PMV-1 virulens bestemt ved sekventering af F-gene kløvningssite, samt AI subtype fundet ved PCR direkte på originalmaterialet.

Virus	Art	Prøve-id	AI subtype på originalmateriale
PMV-1, avirulent	Krikand	17-13660-16	Ikke-H5/H7
PMV-1, avirulent	Gråand	17-14075-9	Ikke-H5/H7
PMV-1, avirulent	Krikand	17-14704-21	Ikke-H5/H7
PMV-1, avirulent	Gråand	17-15468-53	Ikke-H5/H7
PMV-1, avirulent	Gråand	17-17735-39	Ikke-H5/H7
PMV-1, avirulent	Bramgås	17-19473-29	H5 LPAI
PMV-6	Gråand	17-13999-17	Ikke-H5/H7
PMV-6	Krikand	17-14704-21	Ikke-H5/H7
PMV-8	Spidsand	17-15397-10	Ikke-H5/H7

Bilag 4. Match mellem virus sekvenser og primere og prober i diagnostiske H5 RT-PCR assays

Mismatch mellem virussekvens og primere og prober er markeret med rødt. "----" angiver at sekvens ikke er bestemt. Ct-værdierne i pan Influenza A virus real-time RT-PCR "AI-matrix", real-time H5 HA2 og real-time H5CS er angivet.

Konventionel H5 KHA			
Ct AI-matrix	Virus/primernavn	KHA-1	KHA-3 rev compl.
	primersekvens	CCTCCAGARTATGCMTAYAAAAATTGTC	CARGGMATGGTAGACGGTTGGTA
-	A/mallard/Denmark/64650/2003(H5N7)HA_AY531029	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGACGGTTGGTA
-	A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGACGGTTGGTA
24,0	A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
29,0	A/common_teal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
24,3	A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
27,3	A/common_teal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,1	A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/11-2014(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,8	A/mallard/Denmark-4733/16917-59w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
14,9	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,4	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,0	A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,1	A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,4	A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
27,1	A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,0	A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
35,0	A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
34,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
35,3	A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33,3	A/Eurasian_teal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
29,6	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,0	A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
14,3	A/mallard/Denmark/11887-1Kp2/2016(H5N2)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28,0	A/mallard/Denmark/14671-42w/2016(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark/14671-43w/2016(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28,0	A/mallard/Denmark/14671-44w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33,0	A/mallard/Denmark/14671-47w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
35,0	A/mallard/Denmark/14824-79w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33,9	A/mallard/Denmark/18314-40w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark/19080-43w/2016(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33,0	A/mallard/Denmark/20546-18w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,0	A/mallard/Denmark/20546-19w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark/20546-20w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
34	A/mallard/Denmark/16246-46/2017-10-16(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33	A/mallard/Denmark/17731-7/2017-11-23(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32	A/Eurasian_teal/Denmark/16147-7w/2017-10-11(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
27	A/Eurasian_teal/Denmark/14704-22w/2017-10-01(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33	A/mallard/Denmark/16246-47w/2017-10-16(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33	A/barnacle_goose/Denmark/19473-27/2017-12-03(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
26	A/barnacle_goose/Denmark/19473-29/2017-12-03(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30	A/mallard/Denmark/15399-8w/2017-11-13(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
26	A/Eurasian_teal/Denmark/14704-20w/2017-10-01(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28	A/mute_swan/Denmark/17734-4/2017-11-18(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32	A/Northern_pintail/Denmark/15396-36/2017-10-20(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
36	A/mallard/Denmark/15467-58w/2017-10-09(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA

H5

Ct AI- matrix	Ct H5	Virus/primernavn	H5LH1	H5PRO	H5RH1 rev compl.
		primersekvens	ACATATGACTACCCACARTATTTCAG	TCWACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGRTAGCTGGTCT
-	-	A/mallard/Denmark/64650/2003(H5N7)HA_AY531029	ACATATGACTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
-	-	A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	ACATATGACTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
24,0	35,9	A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	ACATA CGA TTACCC GCA TTAT AC AG	TCAAC G GTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
29,0	33,7	A/common_teal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	ACATA CGA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAAC G GTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
24,3	25,7	A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	ACATA CGA TTACCC GCA TTAT AC AG	TCAAC G GTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
27,3	38,4	A/common_teal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	ACATA CGA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAAC G GTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,1	32,7	A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/11-2014(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	31,0	A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,8	0,0	A/mallard/Denmark-4733/16917-59w/09-2015(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTC CT AGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
14,9	16,5	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,4	36,7	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	33,0	A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,0	33,7	A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,1	37,9	A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,4	32,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,0	35,5	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	ACATA CGA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
27,1	33,1	A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGG TA AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,0	35,3	A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35,0	0,0	A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
34,6	38,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35,3	37,8	A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,3	37,6	A/Eurasian teal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
29,6	0,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,0	35,9	A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
14,3	21,7	A/mallard/Denmark/11887-1Kp2/2016(H5N2)	ACATATGA TT ACCC GCA TTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,0	34,0	A/mallard/Denmark/14671-42w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	37,0	A/mallard/Denmark/14671-43w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,0	35,0	A/mallard/Denmark/14671-44w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,0	0,0	A/mallard/Denmark/14671-47w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC GCA ATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35,0	0,0	A/mallard/Denmark/14824-79w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,9	0,0	A/mallard/Denmark/18314-40w/2016(H5)	ACATATGA TT ACT TCG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	37,0	A/mallard/Denmark/19080-43w/2016(H5)	ACATATA AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,0	0,0	A/mallard/Denmark/20546-18w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC GCA ATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,0	36,6	A/mallard/Denmark/20546-19w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC GCA ATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	37,5	A/mallard/Denmark/20546-20w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC GCA ATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
34	37,4	A/mallard/Denmark/16246-46/2017-10-16(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC AA GTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33	0	A/mallard/Denmark/17731-7/2017-11-23(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTA CT CAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32	0	A/Eurasian_teal/Denmark/16147-7w/2017-10-11(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
27	29	A/Eurasian_teal/Denmark/14704-22w/2017-10-01(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
33	38,2	A/mallard/Denmark/16246-47w/2017-10-16(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTATCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
33	38,4	A/barnacle_goose/Denmark/19473-27/2017-12-03(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
26	31,8	A/barnacle_goose/Denmark/19473-29/2017-12-03(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30	35,0	A/mallard/Denmark/15399-8w/2017-11-13(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
26	33	A/Eurasian_teal/Denmark/14704-20w/2017-10-01(H5)	ACATA CA ATTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28	31,4	A/mute_swan/Denmark/17734-4/2017-11-18(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32	39	A/Northern_pintail/Denmark/15396-36/2017-10-20(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
36	0	A/mallard/Denmark/15467-58w/2017-10-09(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	-----	-----

H5CS

Ct AI-matrix	Ct H5CS	Virus/primernavn	H5CS-240L	H5CS-240Prolno	H5CS-192R rev compl.
		primersekvens	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	IGAATGCCCCAAATAYGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
-	-	A/mallard/Denmark/64650/2003(H5N7)HA_AY531029	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
-	-	A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
24,0	25,2	A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
29,0	32,5	A/common_teal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
24,3	26,1	A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
27,3	33,5	A/common_teal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,1	31,6	A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/11-2014(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	31,0	A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	GACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,8	34,1	A/mallard/Denmark-4733/16917-59w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
14,9	11,1	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
30,4	28,5	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	30,8	A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,0	30,1	A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,1	29,3	A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
30,4	29,5	A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
28,0	29,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
27,1	28,6	A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,0	31,5	A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
35,0	37,6	A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
34,6	34,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)	-----	-----	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
35,3	34,2	A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
33,3	34,6	A/Eurasian _teal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
29,6	36,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)	-----	-----	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,0	31,9	A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)	-----	-----	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
14,3	12,4	A/mallard/Denmark/11887-1Kp2/2016(H5N2)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
28,0	29,0	A/mallard/Denmark/14671-42w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	31,0	A/mallard/Denmark/14671-43w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
28,0	29,0	A/mallard/Denmark/14671-44w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
33,0	34,0	A/mallard/Denmark/14671-47w/2016(H5)	-----	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
35,0	34,0	A/mallard/Denmark/14824-79w/2016(H5)	---CCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
33,9	34,1	A/mallard/Denmark/18314-40w/2016(H5)	-CACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	30,0	A/mallard/Denmark/19080-43w/2016(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
33,0	34,6	A/mallard/Denmark/20546-18w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
30,0	33,2	A/mallard/Denmark/20546-19w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	34,2	A/mallard/Denmark/20546-20w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
34	35	A/mallard/Denmark/16246-46/2017-10-16(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
33	33,4	A/mallard/Denmark/17731-7/2017-11-23(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
32	34	A/Eurasian _teal/Denmark/16147-7w/2017-10-11(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
27	27	A/Eurasian _teal/Denmark/14704-22w/2017-10-01(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
33	33	A/mallard/Denmark/16246-47w/2017-10-16(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
33	34,3	A/barnacle_goose/Denmark/19473-27/2017-12-03(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
26	27,8	A/barnacle_goose/Denmark/19473-29/2017-12-03(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
30	29,8	A/mallard/Denmark/15399-8w/2017-11-13(H5)	AAATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
26	29	A/Eurasian _teal/Denmark/14704-20w/2017-10-01(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
28	28,5	A/mute_swan/Denmark/17734-4/2017-11-18(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
32	32	A/Northern_pintail/Denmark/15396-36/2017-10-20(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
36	35	A/mallard/Denmark/15467-58w/2017-10-09(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	-----

Bilag 5. Projektplan for overvågningen af AI i vilde fugle i Danmark 2017.



Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2017.

Der er indgået aftale mellem Fødevarestyrelsen (FVST) og DTU Veterinærinstituttet (DTU-VET) vedr. passiv overvågning for aviær influenza i døde vilde fugle i 2017 jf. "Aftale nr. 2 om overvågning af sygdomme og gennemførelse af projekter i 2017 (West Nile Virus, virus i flagermus, resistens, sygdomsdatabase samt overvågningsprogrammer der afregnes efter antal prøver)". Overvågningsprogrammet afregnes efter antallet af prøver.

Der er indgået aftale mellem FVST og DTU-VET om den årlige aktive overvågning for aviær influenza i vilde fugle 2017-19 jf. "Aftale nr. 3 om overvågning af sygdomme og gennemførelse af projekter for 2017-19 (vektorer, svineinfluenza, afrikansk svinepest og fugleinfluenza)". Aftalen er 3-årig, med et årligt budget på 650.000 kr. FVST afholder udgifterne til udtagning af prøver udenfor projektbudgettet i aftalen.

Projektet gennemføres i samarbejde mellem Fødevarestyrelsen (FVST), Statens Naturhistoriske Museum, KU (SNM) og Veterinærinstituttet DTU (DTU-VET).

Vildfugleovervågningen i 2017 omfatter:

- 1) En EU koordineret passiv overvågning for højpatogen aviær influenza (HPAI) virus i vilde fugle fundet døde eller syge, i medfør af Kommissionens Afgørelse 2010/367/EU¹.
- 2) En national aktiv overvågning (screening) for lavpatogen aviær influenza (LPAI) virus i levende vilde fugle, herunder nedlagte fugle.
- 3) Molekylær karakterisering af udvalgte virus og gener fra 1) + 2) og evt. virus fra fjerkræ. Der fokuseres på karakterisering af H5 og H7. Aktiviteten indgår i et PhD projekt.

Baggrund

FVST er forpligtet til at overvåge for HPAI virus i døde og syge vilde fugle i medfør af Kommissionens Afgørelse¹ af 25. juni 2010 (2010/367/EU). Overvågningen er en del af det EU-baserede overvågningsprogram for AI, der har været gennemført siden 2003, og som løbende er blevet justeret.

FVST udfører en national aktiv overvågning for LPAI virus i levende/nedlagte vilde fugle. Overvågningen foretages som en screening for LPAI virus i vildt levende fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til aviær influenza, herunder undersøgelse af nedlagt vildt (fortrinsvist svømmeænder).

Danmark er i kraft af sin geografiske placering et knudepunkt på efterårstrækket for mange vandfuglearter, der primært yngler nord og nordøst for Danmark. Det er eksempelvis arter som grågås, gråand, krikand, pibeand, troldand, hættemåge, stormmåge m.fl. Enkelte arter kommer dog fra et større område, der strækker sig fra det nordøstlige Canada til Nordsibirien. Det er eksempelvis arter som kortnæbbet gås, knortegås, bramgås og stenvender. De fleste arter overvintrer i Europa og Nordafrika, men især vadefugle trækker længere mod syd. Alene i efterårs- og vintermånederne opholder omkring 3 millioner andefugle sig i de danske farvande. Det samlede antal vandfugle der trækker gennem landet er sandsynligvis langt større.

Hvis syge vandfugle, inficerede med fugleinfluenza, er i stand til at flyve over store afstande, og hvis disse trækfugle kan sprede virus til lokale arter eller omgivelserne, er ophavsområdet til kilde for smitte omfattende.

¹ Kommissionens Afgørelse nr. 367 af 25. juni 2010 om medlemsstaternes gennemførelse af overvågningsprogrammer vedrørende aviær influenza hos fjerkræ og vilde fugle (2010/367/EU)

I dette projekt er målet at indsamle flest mulige positive fugleinfluenzaprøver. Blandt andet derfor er indsamlingerne koncentreret i efterårshalvåret, ud fra den erfaring at chancen for at finde fugleinfluenza er størst i denne periode. Endvidere er indsamlingen koncentreret om de arter, der udgør en forøget risiko med hensyn til fugleinfluenza (jf. EU kommissionsafgørelsen nr. 367 af 25. juni 2010), hvilket primært er vandfuglearter. I projektet har der derfor i de senere år været fokuseret på svømmeænder (især gråand, krikand, pibeand), gæs, svaner og måger.

Dette projekt er konstrueret på en sådan måde, at både artssammensætningen og den geografiske fordeling er stærkt afhængig af SNM's korps af frivillige ringmærkere og deres allerede eksisterende ringmærkningsaktiviteter. Det er lykkedes i de foregående år at indsamle prøver fra en lang række forskellige lokaliteter på tværs af landet, fra Vestjylland til Østsjælland. Dermed vil prøverne sandsynligvis repræsentere de mindre geografiske forskelle der måske er mellem fugle der gæster det vestlige Jylland og dem der gæster Østdanmark.

De enkelte arters træk- og spredningsmønstre er beskrevet i værket Dansk Trækfugleatlas (Bønløkke et. al. 2006).

Fremgangsmåde

Alle prøver, der skal indgå i den passive overvågning (1) og den aktive screening (2), indsendes til DTU-VET førstkommande hverdag efter prøveudtagning.

De sidste prøver i den aktive overvågning skal være modtaget på DTU-VET senest 15. december kl. 10. Der kan maksimalt analyseres ca. 20 pools pr. uge, svarende til max. 100 fugle fra den aktive screening.

1) Passiv overvågning

Formålet med overvågningen er dels at undersøge døde og syge vilde fugle for HPAI virus, dels at få indberetninger om usædvanlig dødelighed og markante sygdomsudbrud hos vilde fugle, der kan være tegn på smitte med aviær influenza.

Fuglearter omfattet af overvågningen fremgår af bilag 1 til denne aftale.

Veterinærenhederne står for visitering og indsendelse af døde og syge vilde fugle indberettet af borgere.

FVST har etableret en aftale med Naturstyrelsen (NS) om, at der indsamles og indsendes døde vilde fugle fra vildtreservater i fem udvalgte enheder.

Egnede undersøgte fugle indsendt til DTU-VET som faldvildt, indgår også i overvågningen.

Det kan være vanskeligt at sikre det ønskede antal døde vilde fugle, idet antallet varierer meget med årstid, lokalitet og vejrlig, især om vinteren. Ligeledes er det kendt, at døde vilde fugle i løbet af kort tid omsættes i naturen f.eks. af predatorer.

Kadaverne indsendes til DTU-VET og undersøgelsen foretages på en trachealsvaber og en kloaksvaber pr. fugl, disse kan pooles for hver fugl til en samlet prøve pr. fugl.

Tidshorisont, PCR resultat: 3 arbejdsdage efter modtagelse. For faldvildt en samlet maksimal svartid fra fund af en fugl til analyseresultat inkl. patogenicitetsbestemmelse foreligger på 8 arbejdsdage.

Resultatet sigter mod at informere om der påvises HPAI virus.

Tidshorisont, opfølgende virusisolation af H5/H7 positive prøver: op til 4-5 uger efter modtagelse. Virusisolationen igangsættes indenfor 4-5 dage, men kan tage op til 4-5 uger.

2) Aktiv overvågning

Der etableres samarbejde med Ringmærkningscentralen under SNM, om indsamling af prøver bl.a. i forbindelse med ringmærkningsaktiviteter i 2017. De arter, der indsamles prøver fra, udvælges, så de bedst muligt tilgodeser ønsket om at indsamle fra fugle, der udgør en forøjet risiko med hensyn til aviær influenza, jf. bilag 1. Antallet af fugle/prøver det tilstræbes at indsamle, fremgår af nedenstående tabel. Der tilstræbes en geografisk fordeling af prøver så der i Hovedstadsregionen max. tages 150 prøver.

I fortsættelse af de tidligere års overvågning vil FVST udtage og indsamle prøver fra nedlagte ænder (gråand, krikand, pibeand) og gæs (gerne kortnæbbet gås), fortrinsvist i perioden 1/9 – 1/12 2017. Prøverne vil blive udtaget fra ænder og gæs indleveret på vildthåndteringsvirksomheder (Kivan Food, Alpevej Vildtbehandling, og Klosterheden Vildt).

Prøverne vil blive indsamlet som kloaksvaber eller evt. fæcesvaber enkeltprøver i kloakmedie (flerstyrkemедie) og poollet i laboratoriet inden undersøgelse. Såfremt der er behov for analyse af enkeltprøver i en positiv pool, kan enkeltprøverne testes; der foretages alene undersøgelse af enkeltprøverne, hvis poolen giver et uklart resultat, hvilket kan være tilfældet ved tilstedeværelse af flere virus i samme pool.

Pooling i laboratoriet foretages således, at en pool kun indeholder max. 5 svabere indsamlet på samme dato, sted (på postnr. niveau) fra samme fugleart.

Fæcesvabere udtages ved at svabe en frisk fæceskat og overføre den til rør med 3 ml AI kloakmedie, hvor der er god sikkerhed for at fuglearten kan afgøres, dvs. klatter efter flokke af fugle der lige er lettet.

Tidshorisont: Primære resultater i løbet af 5 arbejdsdage (influenza A, H5 og H7, H5/H7 LPAI/HPAI) efter modtagelse. Sekundære resultater (subtypning af virusisolater) indenfor 4-5 uger, hvis der er tale om H5 eller H7 subtype og indenfor ca. 2 måneder, for andre H typers vedkommende. Afrapporteres i slutrapporten.

Resultat: sigter i første omgang mod at informere om der forekommer H5 eller H7 AI virus samt karakterisering af H5/H7 subtyper m.h.t. patogenicitet. Endvidere en kortlægning af forekomsten af andre subtyper AI virus i vilde danske fugle.

3) Molekylær karakterisering

Diversiteten af AI virus er stor og identifikation af specifikke virus-varianter kræver en nærmere karakterisering af virus, som giver mere information end subtypen. Formålet er hurtig karakterisering af H7 virus med henblik på identifikation af H7N9-China like virus, hurtig karakterisering af H5 virus, karakterisering af H5 og H7 virus med henblik på evaluering af egnetheden af de anvendte RT-PCR assays til H5/H7 subtypning, subtypebestemmelse af ikke-H5/H7/H9 virus.

Udover virus fra vilde fugle, kan øvrige AI virus, som er identificeret i fjerkræbesætninger mv. i forbindelse med fx AI mistanker og overvågningen i afkom fra opdrættet fjervildt, karakteriseres.

Endvidere vil der blive foretaget en nærmere molekylærbiologisk karakterisering af virus fra H5N8 udbruddet i 2016/2017

Tidshorisont: identifikation af H7N9-China virus ca. 5 arbejdsdage efter påvisning af H7. Resultatet af øvrige analyser rapporteres i slutrapporten.

Laboratoriemæssige undersøgelser

DTU-VET udfører alle analyser. De laboratoriemæssige procedurer for den passive (1) og aktive (2) overvågning er i overensstemmelse med Kommissionens Afgørelse¹ og den diagnostiske manual (Beslutning 2006/437EU). Ikke alle metoder til uddybende molekylær karakterisering (3) er beskrevet i den diagnostiske manual. Det ønskede prøveantal fremgår af nedenstående skema.

1) Overvågning og tidlig påvisning af HPAI virus i døde vilde fugle

Alle prøver undersøges med pan-influenza RT-PCR.

Positive prøver undersøges med H5 og H7 specifik RT-PCR.

H5- og H7-positive prøver patogenicitetsbestemmes ved sekventering.

Der foretages opfølgende virusisolation af H5/H7 positive prøver. Virusisolater karakteriseres med HI-test (H-typning) og N-typning og/eller RT-PCR og sekventering.

2) Screening for LPAI virus i levende vilde fugle, der udgør en forøget risiko med hensyn til aviær influenza inkl. undersøgelse af nedlagte fugle

Alle prøver undersøges med pan-influenza RT-PCR.

Positive prøver undersøges med H5 og H7 specifik RT-PCR.

H5/H7 positive prøver patogenicitetsbestemmes ved sekventering.

Der foretages virusisolation på pan-influenza positive prøver.

Virusisolater karakteriseres med HI-test (H-subtypning) og N-typning og/eller RT-PCR og sekventering.

3) Molekylær karakterisering

Udvalgte prøver fra den passive og aktive overvågning karakteriseres med sekvensanalyse og/eller RT-PCR af HA og evt. NA og øvrige gener. Der sigtes primært på karakterisering af H5 og H7 virus, sekundært på subtypebestemmelse af øvrige AI virus.

Løbende orientering om forløb

I 2. halvår indkalder FVST ved behov til møder (evt. i form af telefon- eller videolinkmøde) mellem FVST, SNM og DTU-VET om status på prøveantal, fund, eventuelle omfordelinger hvis det forventede antal fugle indenfor formålene ikke kan opnås, etc. Ved fravær af møder orienterer parterne hinanden pr. mail månedligt.

Afrapportering

DTU-VET sender resultaterne af den passive overvågning til FVST i form af laboratoriesvar og indtaster endvidere resultaterne i databasen for "Prøveresultater for fugleinfluenza". Resultaterne er hermed tilgængelige på den offentlige vildfugleoversigt på FVST hjemmeside.

FVST foretager de ½-årige pligtige afrapporteringer til EU ultimo juli 2017 og ultimo januar 2018.

DTU-VET udarbejder en samlet slutrapport med resultaterne af den passive og aktive overvågning. Slutrapporten foreligger på dansk senest medio marts 2018.

FVST orienteres straks ved fund af HPAI virus. Fund af LPAI H7N9-China-2013 afrapporteres ligeledes hurtigst muligt, men kræver molekylær karakterisering og kan tage op til 5 arbejdsdage fra påvisning af H7 subtype.

Oversigt over antal fugle og prøver i overvågning af AI i vilde fugle i Danmark 2017

Opgave	Antal fugle	Antal prøver (pools)
<i>Aktiv overvågning i levende vilde fugle</i>		
SNM	450	150
FVST veterinærenheder (nedlagt fjervildt)	450	90
I alt	900	240
	Antal fugle (estimeret)	Antal prøver (estimeret)
<i>Passiv overvågning i døde vilde fugle</i>		
DTU-VET (faldvildt)		
NS		
FVST, Veterinærenheder		
I alt	25	25

Kontaktpersoner

Charlotte K. Hjulsager og Lars E. Larsen, DTU-VET.

Pernille Dahl Nielsen, FVST.

Jesper Johannes Madsen og Kasper Thorup, SNM.

BILAG 1

Liste² over arter af vilde fugle, der skal gøres til genstand for målrettet prøveudtagning og testning for aviær influenza (målarter)

Nr.	Videnskabeligt navn	Almindeligt anvendt navn
1.	<i>Accipiter gentilis</i>	Duehøg
2.	<i>Accipiter nisus</i>	Spurvehøg
3.	<i>Anas acuta</i>	Spidsand
4.	<i>Anas clypeata</i>	Skeand
5.	<i>Anas crecca</i>	Krikand
6.	<i>Anas penelope</i>	Pibeand
7.	<i>Anas platyrhynchos</i>	Gråand
8.	<i>Anas querquedula</i>	Atlingand
9.	<i>Anas strepera</i>	Knarand
10.	<i>Anser albifrons albifrons</i>	Blisgås (europæisk underart)
11.	<i>Anser anser</i>	Grågås
12.	<i>Anser brachyrhynchus</i>	Kortnæbbet gås
13.	<i>Anser erythropus</i>	Dværggås
14.	<i>Anser fabalis</i>	Sædgås
15.	<i>Ardea cinerea</i>	Fiskehejre
16.	<i>Aythya ferina</i>	Taffeland
17.	<i>Aythya fuligula</i>	Troldand
18.	<i>Branta bernicla</i>	Knortegås
19.	<i>Branta canadensis</i>	Canadagås
20.	<i>Branta leucopsis</i>	Bramgås
21.	<i>Branta ruficollis</i>	Rødhalsed gås
22.	<i>Bubo bubo</i>	Stor hornugle
23.	<i>Buteo buteo</i>	Musvåge
24.	<i>Buteo lagopus</i>	Fjeldvåge
25.	<i>Cairina moschata</i>	Moskusand
26.	<i>Ciconia ciconia</i>	Hvid stork
27.	<i>Circus aeruginosus</i>	Rørhøg
28.	<i>Cygnus columbianus</i>	Pibesvane
29.	<i>Cygnus cygnus</i>	Sangsvane
30.	<i>Cygnus olor</i>	Knopsvane
31.	<i>Falco peregrinus</i>	Vandrefalk
32.	<i>Falco tinnunculus</i>	Tårnfalk
33.	<i>Fulica atra</i>	Blishøne
34.	<i>Larus canus</i>	Stormmåge

² Liste fra Kommissions beslutning nr. 367 af 25. juni 2010 om medlemsstaternes gennemførelse af overvågningsprogrammer vedrørende aviær influenza hos fjerkræ og vilde fugle

35. | *Larus ridibundus* | Hættemåge |
36. | *Limosa limosa* | Stor kobbersneppe |
37. | *Marmaronetta angustirostris* | Marmorand | (findes ikke i DK)
38. | *Mergus albellus* | Lille skallesluger |
39. | *Milvus migrans* | Sort glente | (sjælden i DK)
40. | *Milvus milvus* | Rød glente |
41. | *Netta rufina* | Rødhovedet and |
42. | *Phalacrocorax carbo* | Skarv |
43. | *Philomachus pugnax* | Brushane |
44. | *Pica pica* | Husskade |
45. | *Pluvialis apricaria* | Hjejle |
46. | *Podiceps cristatus* | Toppet lappedykker |
47. | *Podiceps nigricollis* | Sorthalset lappedykker |
48. | *Porphyrio porphyrio* | Sultanhøne | (findes ikke i DK)
49. | *Tachybaptus ruficollis* | Lille lappedykker |
50. | *Vanellus vanellus* | Vibe |